

D10

**LAWYERS' AND MERCHANTS' TRANSLATION BUREAU, INC.**

**Legal, Financial, Scientific, Technical and Patent Translations**

**11 BROADWAY  
NEW YORK, NY 10004**

**Certificate of Accuracy**

**TRANSLATION**

From Spanish Into English

**STATE OF NEW YORK  
COUNTY OF NEW YORK**

} s.s.:

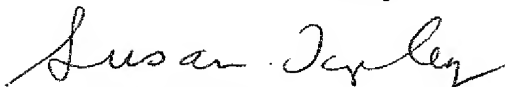
On this day personally appeared before me  
who, after being duly sworn, deposes and states:

That I, Elisabeth A. Lucas, Authorized Officer of **LAWYERS' AND MERCHANTS'  
TRANSLATION BUREAU** declare

That to the best of my knowledge and belief, the attached document, prepared by one  
of its translators competent in the art and conversant with the Spanish and English  
languages, is a true and correct translation into the English language of the accompanying  
document.

**SUBSCRIBED AND SWORN TO BEFORE ME  
THIS**

SEP 05 2008



Susan Tapley  
Notary Public, State of New York  
No. 01TA4999804  
Qualified in Queens County  
Certificates filed in New York County  
and Kings County  
Commission expires July 27, 2010



# TITLE

Vaccine against Salmon Rickettsial Syndrome based on DNA fragments that code for the soluble lytic transglycosidase (SLT70) and membrane lytic transglycosidase (MLTB) proteins of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof.

# ABSTRACT

A DNA vaccine for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, especially in aquaculture species, such as the Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), the Atlantic salmon (*Salmo salar*), the Chinook salmon (*O. tshawytscha*) or the trout (*O. mykiss*), based on a DNA fragment that codes for the soluble lytic transglycosidase and/or membrane lytic transglycosidase proteins. The method of preparation of this DNA vaccine against *Piscirickettsia salmonis* that comprises the following stages: a) Cloning the DNA fragment that codes for the soluble lytic transglycosidase (SLT70) and membrane lytic transglycosidase (MLT) proteins of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof, b) Inserting it in a suitable plasmid vector for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

The invention also describes the use of this DNA fragment in the production of a genetic vaccine against *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates and a vaccine based on a recombinant protein prepared from this fragment.

## DESCRIPTION

### Field of the invention

The present invention relates to a DNA vaccine for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, especially in aquaculture species, such as the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout, based on a DNA fragment that codes for the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins of *P. salmonis*, and the method of preparation thereof. The invention also describes a DNA segment for use in the production of a vaccine against *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates and a vaccine based on a recombinant protein prepared from this oligonucleotide.

## BACKGROUND

### Description of the prior art

#### SALMON RICKETTSIAL SYNDROME (SRS)

The intracellular bacterium *Piscirickettsia salmonis*, the causative agent of the disease called Salmon Rickettsial Syndrome (SRS), has been, since just before its identification (Fryer et al., 1990), an increasing problem for the salmon industry in Chile. Initially described as a

pathology that only affected the Coho salmon, it then spread to the trout and to the Atlantic salmon. However, the situation was made worse not only by the spread of the disease to other salmonid species cultivated in this country, but also because during the past decade this disease has become more virulent, and year after year the associated mortality, the costs of treatment and the effects on productivity and on the quality of the final product have increased.

Measures for mitigating the disease that are currently employed at cultivation centers are mainly based on treatments with antibiotics and other management measures such as the application of rest periods between productive cycles, in order to avoid horizontal transmission, the use of some commercially available immunostimulants, and limitation of vertical transmission, by means of expensive methods of reproductive selection. In the absence of effective vaccines, the steps enumerated above are the only weapons that the fish farmer has used for limiting the effects of the disease.

Not all of these methods are fully developed, nor fully incorporated in the production methodologies, and in some cases they are not applied completely or correctly. The end result is the appearance of strains of *Piscirickettsia* of greater virulence, and interaction with other bacterial, viral and parasitic diseases that have been added year by year to the list of diseases that the fish farmer has to



contend with. This explains why the situation has worsened over the years.

There is still no real solution to Salmon Rickettsial Syndrome. Treatments with antibiotics are becoming less and less effective. Their successful application is uncertain and there is only a response when they are applied very early, and in many cases the administration of the antibiotic by injection is the only feasible solution. In the medium term, the only viable solution will be to use vaccines for immunizing the fish, before they are exposed to the conditions of marine cultivation, where horizontal propagation of the disease is very efficient, since the survival of the bacterium in fresh water is very low.

The vaccines currently being marketed consist of bacterins with restricted use and with scant documentation regarding their efficacy. Furthermore, the production of bacterins for SRS is very expensive, owing to the complexity of the system for cultivation of the pathogen. The in-vitro production of *Piscirickettsia*, an obligate intracellular bacterium, requires the inoculation of the bacterium on a culture of the appropriate cell line. The fact that these bacterins are produced in the complex systems just described has effects on the level of control of the antigens produced; thus, it is possible that the bacteria grown do not contain the antigens or do not contain them at the level required for

inducing the desired protection. An alternative to bacterins is the directed production of antigens, by cloning the genes that encode the desired antigens of the pathogen in a bacterium that is easier to cultivate, for producing the antigens. The production of vaccines by this technique gives rise to what are known as recombinant DNA vaccines. There are two possible presentations for this type of vaccine: suspension of attenuated cells in a suitable type of coadjuvant (generally of the oily type), or suspension of the fractionated antigens from the cultivated bacterium in a suitable coadjuvant. In both cases some postvaccination side effects are to be expected, manifested as a decrease in growth for some weeks following vaccination, and some peritoneal adhesions, that might affect the quality and/or growth of the fish. The latest generation of vaccines are the DNA vaccines, consisting of injection of minimal amounts of genetic material that encodes specific antigens of the pathogen. In this way, the host begins to produce the encoded antigens *in situ*. The genetic material introduced will have an average life of a few days, after which it disappears, after fulfilling its function.

## ANALYSIS OF THE PRIOR ART

### VACCINES IN AQUACULTURE, VACCINES FOR SRS

#### General background

The national salmon industry has now developed into an important source of foreign currency for this country, generating employment and permitting the development of other companies associated with the sector. In 1998, the net national production of salmon and trout reached a volume of 181 600 tons, generating foreign currency to a total of US\$ 713.5 million (see Salmonoticias No. 72; p. 4-6; 1999). However, this activity has not been without problems, and to the accusation of dumping and the sharp decline of the Japanese market, the main destination of Chilean salmon, must be added the economic losses arising because the salmon are dying. The mortality of salmon in captivity is due to various factors, among which we may mention the activity of predators, poor sanitary procedures, and the high density of fish per cage. Nevertheless, it is diseases, and principally those caused by infectious agents, that are characterized by causing massive losses (see Salmonoticias No. 71; p. 12-13 and No. 72; p. 18-19; 1999). At present the specimens produced in Chile are mainly attacked by microorganisms such as *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of BKD

(Bacterial Kidney Disease) and another of a rickettsial nature such as *Piscirickettsia salmonis* that is the causative agent of rickettsial syndrome of salmonids, a pathology that has undoubtedly caused the greatest losses for the salmon industry in Chile. The amount of money that is lost due to this disease has been evaluated at more than US\$ 100 million annually, if we include both the direct costs in terms of mortality, treatment, feeding, as well as the loss of potential profits (Obach A., et al., 1998). Another infectious agent that is causing problems in this sector is a virus belonging to the genus *Birnaviridae* known as Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) (Bruno D., and Poppe T., 1996). This virus possesses a double-stranded RNA that causes a serious clinical picture in the fish infected, resulting in substantial mortality (Bustos P., et al., 1999). More recently, there are fears concerning the appearance of another virus that causes infectious anemia in salmon or ISAV (see Salmonoticias No. 71; p. 11; 1999 and Cassigoli J., 1999). Finally, the mycotic agents, such as those belonging to the genus *Saprolegnia*, are also a constant threat to all the species of salmonids grown in Chile (Enríquez R., 1999).

Salmon Rickettsial Syndrome appeared for the first time in 1989 in the south of Chile and was reported in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), but it was then found that it also affected the Atlantic salmon (*Salmo salar*), Chinook salmon (*O. tshawytscha*), rainbow trout (*O. mykiss*), among

other species of salmonids (Bravo and Campos, 1989). The clinical signs that characterize a fish affected with rickettsial syndrome are swimming on the surface of the water, lethargy, anorexia, approaching the shore, impact against the walls of the cages and darkening of the skin. The most important macroscopic external lesions include desquamation, paleness of the gills, ecchymotic hemorrhages and petechiae at the base of the fins, skin nodules and ulcers, and the hematocrit levels reflect severe anemia (Elizalde J., 1993). Autopsy of the abdominal cavity often reveals the presence of ascitic liquid, nephromegaly and splenomegaly, whitish nodules in the liver, presence of a pseudomembrane in the heart and petechial hemorrhages in the stomach, intestine, swim bladder, muscular and visceral fat. In the majority of cases, the intestine is filled with yellowish mucous contents and the stomach with a clear, seromucous liquid. From the histopathological standpoint the main lesions correspond to necrosis in various organs and tissues, with the kidney, liver, intestine and brain being the most affected. In addition, macrophages containing microorganisms within the cytoplasm may be found (Larenas et al., 1998).

The etiological agent of this syndrome was identified for the first time in 1990 by Fryer (Fryer et al., 1990); however, it was not until 1992 that the relation of this bacterium with other species of rickettsias could be

established more specifically, determining, from the sequence of the 16S RNA gene, the origin of a new genus and a new species that was named *Piscirickettsia salmonis* (ATCC UR 1361) (Fryer et al., 1992; Fryer, 1997). The bacterium is characterized by being Gram-negative, pleomorphic, immobile, nonencapsulated, coccoid, varying in size between 0.5 and 1.5  $\mu\text{m}$ . In culture, this pathogen only grows in salmon cell lines, such as CHSE-214 cells, within cytoplasmic vacuoles associated with others forming clusters of bacteria, although it has also been observed as isolated rings. It stains with Giemsa's reagent, hematoxylin-eosin, methylene blue, among others. Using electron microscopy, it was observed that this bacterium has two membranes, one external undulating and one internal cytoplasmic, as has been observed in other rickettsial agents. Using the same technique, it was possible to demonstrate the presence of structures similar to ribosomes near the plasma membrane, a fibrillar DNA in the central region and electron-dense spherical structures (Larenas et al., 1998).

#### Preventive measures

SRS has now been controlled partially by the use of antibiotics, which have not proved completely effective in combating the disease. Antibiotics with better prospects for the treatment of SRS include the quinolones, on account of

their broad spectrum, low CMI and intensively bactericidal action. However, these drugs have side effects, such as the development of resistance in the pathogens, toxicity, hypersensitivity and immunosuppression (Arriagada R., 1996). The use of antibiotics has problems connected with regulations approved in 1997 by the FDA of the United States of America and by the European Economic Community that will require that all products from aquaculture will have to reach their respective markets without residues of antibiotics. This will undoubtedly be a problem for Chilean producers, bearing in mind that in Chile, 80% of the antibiotics available on the national market are intended for combating *P. salmonis* (see Aquanoticias No. 37; p. 20; 1997).

#### Bacterins and vaccines based on recombinant proteins

Recently, Smith et al. (1997) described the results of partial protection obtained on immunizing Coho salmon with a conventional bacterin for *P. salmonis*, prepared with the ATCC strain of the pathogen grown in CHSE-214 cells and then fixed with paraformaldehyde. The fish were challenged naturally, that is by transferring them after smolting to a site with endemic piscirickettsiosis.

Gaggero submitted in 1995 a Chilean patent application (Gaggero, 1995) relating to a method of production of a vaccine against Salmon Rickettsial Syndrome

produced by the bacterium *Piscirickettsia salmonis*. The method described in said patent application comprises a process for production of an inactivated vaccine, of the bacterin type. For this, initially the bacterium must be propagated in fish cell cultures and, once purified, it is inactivated and diluted in a suitable solvent, and is then ready for use by injection.

Vaccines based on recombinant proteins are another possibility. If we succeed in identifying antigens involved in the humoral and/or cellular immune response of salmonids against *P. salmonis*, it is possible, using the methods of molecular biology, to clone and express these molecules in suitable vectors, whether in bacteria, yeasts or animal cells, and then study their protective character. Methods of this type have been used in the investigation of numerous pathologies that affect humans, and among them, some of the diseases that are caused by bacteria of the genus *Rickettsia*.

In the case of scrub typhus (tsutsugamushi fever), caused by *R. tsutsugamushi*, it was determined that two polypeptides are present, with molecular weights of 56 and 58 kDa, localized on the surface of the bacterium, which are said to be predominant in the infection (Tamura et al., 1985) and whose genes have been cloned (Stover et al., 1990 a). In the case of Rocky Mountain fever, caused by *R. rickettsii*, the gene for a protein of 155 kDa, localized in the cell wall of the bacterium, has been identified and cloned, and the



presence of heat-sensitive epitopes has been determined using monoclonal antibodies. This antigen, when inoculated in mice, protects them from the lethal effect of the bacterium (McDonald et al., 1987). It is interesting to note that a similar protein of 155 kDa has been identified in *Rickettsia conorii* and the gene that encodes it has been cloned and expressed in *E. coli*. When guinea pigs are inoculated with a lysate of the recombinant bacterium, protection is obtained against infection with the homologous strain of *Rickettsia conorii* as well as partial protection against experimental infection with a heterologous strain like *Rickettsia rickettsii* (Vishwanath et al., 1990).

#### DNA vaccines

The development of new strategies of vaccination against *P. salmonis* is justified by the fact that to date the disease has not been controlled and only one commercial vaccine of the bacterin type is approved at present, but its results are controversial for experts in animal health with reference to SRS (see Aqunoticias No. 47; p. 7; 1999). There are several vaccines at the experimental stage, five of them are of the bacterin type, one is an isolated protein (purified antigen) and one is based on recombinant DNA (see Aqunoticias No. 47; p. 9; 1999). The production of a vaccine of the bacterin type involves the culture, purification and

subsequent inactivation of the bacterium. The cultivation process can take up to 2 weeks when there are no problems of contamination, a fact that is not trivial when dealing with the cultivation of a bacterium that in cell culture is practically sensitive to all antibiotics. The purification process is expensive, slow and unsuitable for scaling-up as would be required for mass vaccination of millions of salmon. It has also been demonstrated that vaccination with bacterins requires adjuvants for potentiation of the immune response of the fish and booster doses, a situation that leads to rejection by the salmon farmers because it involves double manipulation of the fish, which can generate such a high level of stress that it can cause higher mortality than might result from a possible outbreak of SRS (see Aquanoticias No. 47; p. 8; 1999). Moreover, no works are known in which it is demonstrated that bacterins are able to induce cellular immunity, which is very important when dealing with pathogens that live within the cell, such as *P. salmonis*. On the other hand, vaccination with pure antigens also leads to problems, among which we may mention the fact that they are proteins, usually obtained from recombinant DNA, that are cloned and expressed in microorganisms, generally produced within inclusion bodies, from where they must be recovered and purified, a process that takes time and increases the costs of production. Moreover, once obtained, the proteins must be kept cold for optimal functioning, so that they are not

practicable in regions that lack cold chain systems. Other vaccination systems, such as those based on viral vectors, have the shortcoming that they may be inefficiently attenuated and may revert to a virulent strain (Hilleman R., 1995). Moreover, since they have to be incorporated in the host's genome they may cause undesirable mutations (Kurth R., 1995).

The technology of vaccination with nucleic acids relates to the method by which an immune response to a protein expressed "in vivo" is induced after the introduction of an oligonucleotide sequence that codes for this protein. This technology is radically different from the classical vaccines that contain the immunogenic material, either in the form of an inactivated pathogenic agent or more recently as a subunit of the pathogenic agent, either purified from the pathogen or produced by recombinant DNA or by chemical synthesis of peptides. The possibility of developing vaccines based on nucleic acids dates back to 1990 when Felgner and co-workers (Wolff et al., 1990; Felgner et al., 1995) described how the injection of reporter genes in muscle cells resulted in the expression of the proteins encoded by the genetic material. Two years later Tang and co-workers (Tang et al., 1992) demonstrated that the immunization of animals with microspheres of colloidal gold covered with plasmid DNA led to the appearance of an immunogenic response in the animals to the proteins encoded by the injected DNA. Later

on, Liu and co-workers (Ulmer et al., 1993) demonstrated that the immunization of animals with DNA that encodes proteins of the influenza virus induced protective immunity to the pathogen. In these experiments, mice were immunized with plasmid DNA containing an insert encoding the proteins of the virus, which developed a humoral and cellular immune response that was sufficient to protect the animals from a lethal challenge with the influenza virus. Recently, several investigators have reported the efficacy of immunizations with DNA for inducing protective immune responses in animal models of several infectious diseases, some of which include intracellular pathogens like *P. salmonis*. These include influenza (Ulmer et al., 1993; Montgomery et al., 1993; Robinson et al., 1993), (Xiang et al., 1994), malaria (Sedegah et al., 1994; Hoffman et al., 1995), leishmaniasis (Xu et al., 1994), papilloma virus (Donnelly et al., 1995), herpes (McClements, 1995; Rouse, 1995), tuberculosis (Lozes E. et al.; Lowrie D. et al. 1997) and bovine herpes virus (Babiuk et al., 1995).

The nucleic acid vaccines can be based on RNA or on DNA, although the vast majority of the studies conducted in animals to date were based on DNA. Although messenger RNA is undoubtedly more attractive from the standpoint of the low possibility of integration in the genome, it does not appear to be the vehicle of choice owing to its instability and greater difficulty of production.

Two factors have to be taken into account when considering what type of tissue is best for immunizations with DNA vaccines, namely the level of antigen expressed and the accessibility of the antigen to the immune system. The amount of antigen produced will depend on the amount of DNA incorporated in the cells, which in its turn depends on the type of cells and on the formulation of the DNA. The level of expression will depend partly on the activity or potency of the promoter and on other genetic elements that optimize the transcription and translation occurring in the vector. For one and the same promoter, this activity can vary in different tissues. The expression vectors possess an efficient promoter, which are usually viral promoters such as those of the human cytomegalovirus, simian virus 40 (SV40), Rous sarcoma virus (RSV). These promoters are not tissue-specific, they have constitutive expression, and can be replaced by species- and tissue-specific promoter/enhancer elements as is the case with the  $\beta$ -actin gene of the carp *Cyprinus carpio* (Liu Z. et al., 1990). Moreover, from a region that contains sequences for multiple cleavage with various restriction enzymes, the vectors possess a polyadenylation site, for increasing the stability of the mRNA. The polyadenylation sequence of the bovine growth hormone gene, BGHpA, is usually employed for this purpose (Donnelly J., et al., 1997). They must also possess a prokaryotic replication origin, for efficient propagation of

the plasmid in competent *E. coli* cells. The commonest selection markers carried by the plasmid expression vectors used in DNA vaccines are ampicillin or kanamycin. It was found experimentally that if an intron (noncoding sequence) is inserted between the promoter region and the polyadenylation sequence, the efficiency of expression of the vector is increased by several times (Barry M., and Johnston S., 1977).

The accessibility of the antigen to the immune system is another important variable that will depend on its presentation. To induce a humoral type of response, the antigen will have to be presented on the surface of the cell transfected with the DNA or secreted and processed by antigen presenting cells, which will depend on the type of vector used. To induce a cellular response, it will be necessary to induce suitable presentation of peptides derived from the antigen by molecules encoded by the MHC of the host system (Donnelly J., et al., 1997), (Sewell A., et al., 1999; Whitton J., et al., 1999).

The transfer of nucleic acids to the vaccinated animal or individual can be carried out in various ways. The formulation most commonly used is the transfer of plasmid DNA or of DNA contained in a viral vector (adenovirus, retrovirus, vaccinia, herpes, etc.). Plasmid DNA offers several potential advantages as it is very stable and easier to prepare reproducibly. Moreover, in contrast to viral

vectors, plasmid DNA is usually designed to remain in episomal form, i.e. without the capacity for being integrated into the genome of the animal. Many of the viral vectors generally require integration in the genome, which might lead to activation of oncogenes or inactivation of tumor suppressor genes (Nichols et al., 1995). One of the most studied routes of immunization with DNA is direct injection of genetic material into muscular tissue. For example, Davis and co-workers (Davis et al., 1993) demonstrated that a single injection of DNA encoding the surface antigen of the hepatitis B virus, in mouse skeletal muscle, induces a rapid, potent and sustained humoral and cellular immune response. Despite the low efficiency of genetic transfer in mature muscle, it is sufficient for the purposes of immunization. For example, injection of just 10 micrograms of DNA in the mouse anterior tibial muscle induces antibodies at a level above 10 mIU/mL, a level that is considered sufficient for conferring protective immunity in humans (Davis et al., 1993). It was observed that the potency of the immunologic response is clearly related to the dose of the vaccine and the efficiency of transfection. Thus, methods that improve the incorporation of DNA in the cells improve the immunologic response. For example, injection of DNA in 25% sucrose gives a hundredfold increase in the level of antibodies (Davis et al., 1993). These authors also demonstrated that the immune response obtained as a result of immunization with DNA is

persistent, demonstrating that the level of antibodies obtained is maintained for at least 17 weeks after a single injection of DNA.

A very interesting technological variant was described recently by Johnston and co-workers (Barry et al., 1995; Johnston and Barry, 1997). These authors developed a method for the production of DNA vaccines based on immunization with expression libraries, which potentially encode all the proteins of the infectious agent. This makes it possible to develop vaccines even against pathogens for which very few protective antigens are known, since it is not necessary to know what genes of the pathogen are associated with immunity. Barry and co-workers demonstrated that immunization of mice with expression libraries obtained from complete genomic DNA of *Mycoplasma pulmonis*, a natural pathogen of rodents, was able to develop immunoprotection against challenge with the pathogen. This technology is based on the fact that all the antigens of the pathogen are finally encoded in its genome. Accordingly, the method involves making an expression library of the genome of the pathogen in suitable vectors that permit expression of the potential antigenic genes or of a proportion of them that it has been possible to clone. This genome can then be reduced in successive stages of fractionation until individual protective plasmids are obtained. As a result, this approach also makes it possible to discover individual candidate genes



and use them as recombinant vaccines. The critical aspect in the application of immunization with expression libraries is its sensitivity. For example, to cover the genome of a bacterial pathogen of  $3 \times 10^6$  bp in 500 bp fragments would require approximately 6000 clones. However, only 1/6 of these would be in the correct frame and direction. Therefore one equivalent of expression would require 36 000 clones. Finally, it is important to point out that in fish (Kanellos et al., 1999) and specifically in carp (*Cyprinus carpio*), in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and in goldfish (*Carassius auratus* L.), methodology has been described for expressing exogenous genes injected intramuscularly (Hansen et al., 1991; Anderson et al., 1996a and Russell et al., 1998, respectively). In the second case, moreover, Anderson's group demonstrated that trout injected in the skeletal musculature with a plasmid that contains the genes that code for proteins of the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and that are under the control of a cytomegalovirus promoter produce neutralizing antibodies that confer protection on the trout when challenged with IHNV (Anderson et al., 1996b).

Herrmann et al. (United States Patent 6,165,993) describe a concrete application of DNA vaccines for inducing an immune response to rotaviruses in various vertebrates.

For the particular case of the application of DNA vaccines against rickettsial diseases, Barbet et al. (United States Patent 6,025,338) disclosed a composition comprising

an isolated polynucleotide, which is able to induce an immune response to a disease caused by a pathogenic rickettsia, including *Cowdria ruminantium*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma marginale*.

Davis's patent (United States Patent 6,180,614) describes the general use of DNA vaccines as a method of immunization of aquaculture species. This patent also discloses the methods of administration of the DNA expression systems to the fish. Said methods include the techniques of injection, spraying and dipping.

#### Soluble, membrane lytic transglycosidases

The transglycosidases are enzymes that act by hydrolyzing the peptidoglycan that forms part of the bacterial cell wall. Peptidoglycan forms the so-called bacterial sacculus and has the function of protecting the cell from mechanical stress and maintaining the internal osmotic pressure of the bacterium. It is composed of linear chains of N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine crosslinked by small peptides that give the wall rigidity. However, the cell also requires flexibility so that it can grow and divide. This flexibility is provided by a balance between the activities of synthesis and hydrolysis that act on peptidoglycan (Höltje & Schwarz, 1985). To date, about 10 different synthesis activities and about the same number of

hydrolysis activities have been described, which differ at the various points where they cut the macromolecule. In this balance of activities, it is the enzymes that degrade peptidoglycan that possess a fundamental role, not only for rupture of the wall during cell division but also by creating space and new acceptor sites of material for remodeling and growing the wall during cell growth and moreover by permitting the transport of DNA, toxins, flagellum and other proteins through the dense network of peptidoglycan (Höltje, 1995; Höltje & Tuomanen, 1991; Goodell, 1985; Dijkstra & Keck 1996). Among these enzymes, the lytic transglycosylases, originally identified in *E. coli*, are of especial interest. These enzymes hydrolyze the  $\beta$ -1,4 glycosidic linkage between the N-acetylmuramic acid residues and the N-acetylglucosamine residues, completely degrading the peptidoglycan *in vitro*, like the lysozymes (Höltje et al., 1975). But in contrast to the latter, the transglycosylases, concomitant with cleavage, catalyze binding between carbons 1 and 6 of the N-acetylmuramic acid residues, releasing as product from this insoluble network, soluble strands of 1,6-anhydromuropeptides, which have aroused great interest because of their ability to stimulate the mammalian immune system (Dokter et al. 1994) and other properties related to pathogenesis in some species (Melly et al. 1984; Cookson et al., 1989). Uncontrolled activity of the endogenous

transglycosylases causes cellular autolysis, hence the name lytic transglycosylases (Betzner et al., 1990).

Six different transglycosylases have been isolated from *E. coli*. One of these is soluble and is localized in the periplasmic space and has MW of 70 kDa (SLT70) (Engel et al. 1991). The other 5 are lipoproteins that are bound to the outer membrane of Gram(-) bacteria, via its internal face and so are localized in the outermost region of the periplasmic space. These have been designated MLTA (Ursinus & Höltje, 1994; Lommatzsch et al., 1997); MLTB (Ehlert et al., 1995; Engel et al., 1992); MLTC (Dijkstra & Keck 1996); MLTD and EmtA (Kraft et al. 1998). The various enzymes differ not only in their preferred substrate, enzymatic activity and susceptibility to glycopeptide inhibitors (Romeis et al., 1993), but also in their protein sequence, some consensus domains being conserved between the different MLTs (Koonin & Rudd, 1994; Lommatzsch et al., 1997). Genes homologous to these enzymes have been described in *Pseudomonas aeruginosa* (Blackburn and Clark, 2002), *Bordetella pertussis* (Cookson et al. 1989) and *Neisseria gonorrhoeae* (Sinha & Rosenthal, 1980) among others and are expected to be present in a wide range of Gram-negative bacteria. The transglycosidase that has been studied in greatest detail is SLT70, which codes for a monomeric enzyme of 618 aa and is inhibited by the antibiotic Bulgecin A in combination treatment with the  $\beta$ -lactam compound furazlocillin (Templin et al. 1992).

Crystallographic studies have demonstrated a ring-shaped structure, by which the enzyme is said to bind strongly to peptidoglycan (van Asselt et al., 1999 b; Dijkstra & Thunninssen 1994; Höltje, 1996). Some of the membrane transglycosidases are not inhibited by Bulgecin A, which has enabled their activity to be differentiated in experiments *in vivo* and *in vitro*. A fully active soluble enzyme of 35 kDa has been described (SLT35) and is the proteolytic result of hydrolysis of the first 40 amino acids of the 40 kDa membrane enzyme MLT B (Engel et al., 1992; Dijkstra et al., 1995; Ehlert et al., 1995). Just like the 70 kDa soluble transglycosidase (SLT70), the soluble fraction SLT35 bound to fragments of peptidoglycan crystallized, which made it possible to elucidate the various domains and amino acids involved in binding to peptidoglycan (van Asselt & Dijkstra 1999a; van Asselt et al., 2000). SLT35 possesses 3 domains;  $\alpha$ ,  $\beta$  and the active center located between the two that displays folding similar to that of lysozyme and at the active site of SLT70. Despite the difference in amino acid sequence between the 2 SLTs, there is coincidence in some amino acids of the active site in their interaction with substrates. A particular characteristic of SLT35 is the presence, in its active center, of an EF-hand type folding of binding to  $\text{Ca}^{++}$  that imparts thermal stability to the molecule and that previously has only been described in prokaryotes for the periplasmic enzyme for binding to

glucose/galactose (GBP) (Vyas et al., 1987). Both SLT35 and SLT70 are exomuramidases that require the peptide chains of peptidoglycan for their activity (Beachey et al., 1981; Romeis et al., 1993), the N-terminal domain being in the form of a ring of SLT and residues 99-108 of SLT35 being responsible for this activity (van Asselt et al., 1999a, 1999b). In contrast to these last-mentioned transglycosylases, the enzyme MLTA is active on peptide-free strands of glycan (Romeis et al., 1993).

NMR studies have been used for studying the various motifs present in the membrane transglycosylase MLTD and, at the carboxyl terminus of this transglycosylase, the presence of two LysM motifs has been described, which have, as general function, binding to peptidoglycan and are widely distributed in various molecules that are associated with peptidoglycan, especially in enzymes that degrade this macromolecule (Bateman & Bycroft, 2000). Although the precise function of MLTD is unknown, recent data based on the phylogenetic distribution of the protein suggest that it might be involved in flagellar biosynthesis (Pellegrini et al. 1999).

The functions of each of these various transglycosidases in the cell is still unknown but the presence of these various molecules that share the same activity sheds light on the complex mechanism of coordination between synthesis and degradation that must exist to ensure correct growth of the sacculus during cell division to

maintain the specific form of the bacterium. Investigation of protein-protein interaction using affinity chromatography carried out by Vollmer's group (Vollmer et al., 1999; von Rechenberg et al., 1996) demonstrated the interaction of the transglycosidase MLTA with several enzymes responsible for the synthesis of peptidoglycan by reconstituting *in vitro* a multienzyme complex that would suggest the existence of a hypothetical holoenzyme responsible for the controlled growth of the bacterial cell wall.

The transglycosidases are an interesting target for studying peptidoglycan metabolism, even more so if we bear in mind that the activity of these enzymes is directed at the glycosidic linkages between the strands of glycans, which opens up the possibility of designing new antibiotics different from penicillin and the related  $\beta$ -lactam compounds, whose target has been the enzymes that synthesize and hydrolyze bonds of the peptide type that crosslink the strands of glycans (Waxman and Strominger., 1983). Nevertheless, the transglycosylases prove more attractive with respect to biotechnological applications in view of the high immune response of the cellular type to MLTA observed by Pizza's group (Pizza et al., 2000) in selecting surface antigens for developing a vaccine against *Neisseria meningitidis*. This high cellular immunogenicity proves fundamental when selecting candidates for developing a vaccine against an intracellular pathogen as in the case of

*Piscirickettsia salmonis* and especially for a DNA vaccine. The gene isolated from *P. salmonis* for the membrane transglycosylase corresponds to the MLTB type.

#### Definition of the problem solved by the invention

There is now a growing need for vaccines for mass infections of aquaculture species. As already explained, the vaccines currently on the market, based on bacterins, are of limited use and there is scant documentation concerning their efficacy. Moreover, the production of bacterins for SRS is very expensive, owing to the complexity of the cultivation system. The present invention solves the problems of the prior art, applying the latest findings of molecular biology, for producing DNA vaccines and recombinant vaccines against SRS. It makes it possible to produce these vaccines on a large scale and very efficiently, being independent of the complex cultivation systems required for the proliferation of *Piscirickettsia salmonis*.

#### Definition of the invention

The invention relates generally to a DNA vaccine for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, especially in aquaculture species, such as the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or



the trout, based on a DNA fragment that codes for the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins of *P. salmonis*, and the method of preparation thereof. The invention also describes a purified oligonucleotide to be used for the production of a vaccine against *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates and a recombinant vaccine prepared starting from this oligonucleotide.

The term "vaccine" refers here to any material capable of inducing an immune response in the animal that has received said material.

Vaccination with nucleic acids relates to the method by which an immune response to a protein expressed "in vivo" is induced after the introduction of an oligonucleotide sequence that codes for this protein. Therefore, the concept of "DNA vaccine", as used here, refers to any DNA segment that, when introduced into an animal, produces the immune response explained in the preceding sentence.

The main object of the present invention is a DNA vaccine that comprises a DNA fragment that codes for the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof, inserted in a suitable plasmid vector for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

In a preferred embodiment of this invention, said DNA fragment corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 (see Fig. 1) or a fragment thereof. Alternatively, said DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 1, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism that is to be vaccinated. For both embodiments, it has been established that the soluble lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 2 (see Fig. 2) or an immunogenic region thereof.

In another preferred embodiment of this invention, said DNA fragment corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 3 (see Fig. 3) or a fragment thereof. Alternatively, said DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 3, using different codons, preferably the codons that are most used by the vertebrate organism to be vaccinated. For both embodiments, it has been established that the membrane lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 4 (see Fig. 4) or an immunogenic region thereof.

In another preferred embodiment of the DNA vaccine according to the invention, the suitable plasmid vector has the following characteristics: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning

site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker. Preferably, said plasmid vector is the plasmid pUK21-A2.

In particular, said vertebrate corresponds to an aquaculture species, and preferably it is the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout.

In another preferred embodiment of the DNA vaccine according to the invention, it is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular injection, spraying and dipping. Moreover, the vaccine contains a suitable adjuvant and/or a pharmaceutically acceptable carrier.

In another variant of the present invention, the presence of antibodies to the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins generated by the DNA vaccine is detected by a method according to which, after a time, blood is taken from the vertebrate that was vaccinated and the serum is analyzed for the presence of antibodies to the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins.

A second main object of the invention is a method of preparation of the DNA vaccine against *Piscirickettsia salmonis* that comprises the following stages:

- a) Cloning the DNA fragments that code for the soluble lytic transglycosidase (SLT70) and membrane lytic transglycosidase (MLT) proteins of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof.
- b) Inserting it in a suitable plasmid vector for its expression and generation of an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

In a preferred embodiment, the method comprises a DNA fragment that corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 or a fragment thereof. Alternatively, the DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 1, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism that is to be vaccinated. For both embodiments, it has been established that the soluble lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 2 (see Fig. 2) or an immunogenic region thereof.

In another preferred embodiment, the method comprises a DNA fragment corresponding to the nucleotide sequence SEQ ID No. 3 or a fragment thereof. Alternatively, the DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 3, using different codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism to be vaccinated. For both embodiments, it has been established that the membrane lytic

transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 4 (see Fig. 4) or an immunogenic region thereof.

In another preferred embodiment, the method comprises the suitable plasmid vector that has the following characteristics: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping the transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker. Preferably, said plasmid vector is the plasmid pUK21-A2.

In particular, the vertebrate corresponds to an aquaculture species, and preferably it is the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout.

In another preferred embodiment of the method according to the invention, the vaccine is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular injection, spraying and dipping.

A third main object of the invention is one or more purified DNA segments to be used for the production of a vaccine against *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, that code for the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins of *Piscirickettsia salmonis* or immunogenic regions thereof. In a preferred embodiment of this invention, the DNA segment has the nucleotide sequence

SEQ ID No. 1 and/or SEQ ID No. 3 (see Figs. 1 and 3) or fragments thereof. Alternatively, the DNA segment has a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 1 and/or SEQ ID No. 3, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism that is to be vaccinated. For both embodiments, it has been established that the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins of *Piscirickettsia salmonis* correspond to the amino acid sequences SEQ ID No. 2 and SEQ ID No. 4 (see Figs. 2 and 4) or immunogenic regions thereof.

In particular, the vertebrate corresponds to an aquaculture species, preferably the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout.

In another embodiment of the present invention, the oligonucleotide is used for producing a recombinant vaccine for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, where the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof are produced using a suitable expression vector and a suitable host. In particular, the vertebrate corresponds to an aquaculture species, preferably the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout. In another variant, the expression vector is a plasmid, preferably the vector pET32a.

Moreover, it has been determined that the host is a bacterium, preferably *E. coli*.

In another preferred embodiment of the recombinant vaccine according to the invention, it is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular and intraperitoneal injection, spraying and dipping. Moreover, the vaccine contains a suitable adjuvant and/or a pharmaceutically acceptable carrier.

In another variant of the present invention, the presence of antibodies to the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins of *P. salmonis* generated by the recombinant vaccine is detected by a method according to which, after a time, blood is taken from the vertebrate that was vaccinated and the serum is analyzed for the presence of antibodies to the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins of *P. salmonis* by means of ELISA.

#### **Description of the drawings**

Fig. 1:

This diagram shows the nucleotide sequence (SEQ ID No. 1) of the gene that codes for the soluble lytic transglycosidase (SLT70) protein of *Piscirickettsia salmonis*.

Fig. 2:

This diagram shows the amino acid sequence (SEQ ID No. 2) of the soluble lytic transglycosidase (SLT70) protein of *Piscirickettsia salmonis*.

Fig. 3:

This diagram shows the nucleotide sequence (SEQ ID No. 3) of the gene that codes for the membrane lytic transglycosidase (MLT) protein of *P. salmonis*.

Fig. 4:

This diagram shows the amino acid sequence (SEQ ID No. 4) of the membrane lytic transglycosidase (MLT) protein of *Piscirickettsia salmonis*.

Fig. 5:

This diagram shows a schematic representation of the plasmid pUK21-A2.

Fig. 6:

This diagram shows a schematic representation of the plasmid pUK21-A2, containing the insert with the gene of soluble lytic transglycosidase of *P. salmonis*, designated pUK21-A2 SLT70.



Fig. 7:

This diagram shows a schematic representation of the plasmid pUK21-A2 containing the insert with the gene of the membrane lytic transglycosidase of *P. salmonis*, designated pUK21-A2 MLT.

Fig. 8:

This diagram shows the structure of the plasmid pET-32a

Fig. 9:

This diagram shows the structure of the plasmid pET32a-SLT70S1.

Fig. 10:

This diagram shows the structure of the plasmid pET32a-SLT70S2.

Fig. 11:

This diagram shows the structure of the plasmid pET32a MLTS1.

Fig. 12:

This diagram shows the structure of the plasmid pET32a MLTS2.

Fig. 13:

This diagram shows the production of soluble lytic transglycosidase, segment S1 (SLT70S1) and soluble lytic transglycosidase, segment S2 (SLT70S2) of *P. salmonis* in *E. coli*.

Fig. 14:

This diagram shows the production of membrane lytic transglycosidase, segment S1 (MLTS1) and membrane lytic transglycosidase, segment S2 (MLTS2) of *P. salmonis* in *E. coli*.

**EXAMPLES**

The following examples illustrate some concrete applications of the invention, but are not intended to limit the scope of the present invention.

**Example 1:** Isolation, cloning and sequence of the gene of the soluble lytic transglycosidase of *P. salmonis*

a) Culture of CHSE-214 cells

Inocula of CHSE-214 cells (ATCC 1681), stored in liquid nitrogen, were thawed and cultivated in T175 bottles in MEM medium at 16°C for 7 days or until the cells reached confluence.

b) Culture of *P. salmonis*.

Inocula of *P. salmonis* containing at least a titer of  $1 \times 10^8$  bacteria/mL were used for each of the T175 bottles with CHSE-214 cells. On the next day, the medium was withdrawn and 50 mL of fresh MEM-complete medium was added. Culture was carried out at 16°C for 10 to 14 days, periodically observing, with the phase contrast microscope, the degree of lysis of the CHSE-214 cells caused by the bacterial infection. When the cytopathic effect was in the region of 100% of the cells, the culture of *P. salmonis* was considered to be ready for harvesting or for subsequent propagation of the culture. The bacteria were harvested using a cell scraper. Once collected, the lysate was centrifuged and the supernatant collected corresponds to the semipurified fraction of *P. salmonis*.

c) Purification of *P. salmonis*

To purify the bacterium, the suspension with the semipurified fraction of *P. salmonis* was submitted to density gradient centrifugation, obtaining a major band near the bottom of the centrifuge tube. This band was collected and was washed two to three times by centrifugation with a buffer solution. The final sediment or pellet constitutes the purified fraction of *P. salmonis*.

d) Preparation of genomic DNA of *P. salmonis*

Our method is based on Binder's protocol (Binder, 1995). Briefly, the purified fraction of *P. salmonis* was washed with PBS buffer, 20  $\mu$ L of a solution of 10 mg/mL of DNase I was added to it, and it was incubated at 37°C for 30 min. After centrifugation to remove the supernatant, the pellet was resuspended in 500  $\mu$ L of PBS plus 100  $\mu$ L of 0.1M EDTA to stop the activity of the DNase I. It was agitated gently by inversion, centrifuged again and the pellet, without DNase I, was resuspended in 1 mL of lysis buffer (sucrose 0.75 M, NaCl 400 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 50 mM, SDS 0.2%, 1 mg of Proteinase K, pH 9). It was agitated gently by inversion and it was incubated at 58°C for 1 hour, with gentle agitation. On completion of incubation with the protease, the solution was extracted with one volume of phenol saturated with Tris-HCl (pH 8) and was then extracted twice with a 24:1 chloroform-isoamyl alcohol mixture. Next, the DNA was precipitated with 0.4 volumes of 5M ammonium acetate and 2.5 volumes of cold absolute ethanol at -20°C for 30 min.

e) Polymerase chain reaction (PCR)

Autoclaved 500  $\mu$ L Eppendorf tubes were filled with 5  $\mu$ L of PCR buffer 10 X without Mg, 1.5  $\mu$ L of MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 4  $\mu$ L of dNTP mixture 2.5 mM, 2.5  $\mu$ L of each of the oligonucleotide primers (10  $\mu$ M of each), 100 ng of template

DNA, 0.5  $\mu$ L of Taq DNA polymerase 5 U/ $\mu$ L, made up to a final volume of 50  $\mu$ L with milliQ sterile water. The experimental conditions used were as stated by Mauel (Mauel et al., 1996).

f) Agarose gel electrophoresis

To determine the integrity of the genomic DNA of *P. salmonis*, as well as that of the plasmid DNA, and that of the amplification products, 1 and 2% agarose gel electrophoresis was performed. This method was carried out according to Sambrook (Sambrook et al., 1989).

g) Cloning and sequencing of the gene of the soluble lytic transglycosidase (SLT70) protein of *P. salmonis*.

Using algorithms for comparing the sequence homology of DNA (PCGene and National Center for Biotechnology Information), the localization of the most conserved sequences in the gene of the soluble lytic transglycosidase of gamma proteobacteria and of other bacteria whose genes of these proteins display homologies with *P. salmonis*. In parallel, analyses of hydrophilicity of these species were performed to determine the regions of the protein where there are strong antigenic determinants. The regions of the gene of the soluble lytic transglycosidase of *P. salmonis* to be amplified by PCR were defined on the basis of this information.

The gene of SLT70 is isolated from DNA of *P. salmonis* using the primers a) sense: 5'-CAGGAATTCGACATAATGCCATACTACACTT-3' and b) antisense: 5'-CAGCTCGAGTTAAACACGCCTAATTCCAGCATT-3', which were used in a polymerase chain reaction, using highly purified chromosomal DNA of *P. salmonis* as template. This process gave rise to a fragment of approximately 1775 base pairs that was cloned in the vector pGEMt. Once DNA of the resultant plasmid (pGEMt SLT70) was isolated, the insert was sequenced, demonstrating the presence of a gene that codes for a protein SLT that lacks 58 amino acids from its carboxyl terminus and of high homology with the soluble lytic transglycosidase of other organisms.

The gene of MLT is isolated from genomic DNA of *P. salmonis* using the primers a) sense: 5'-GACGAATTCATGAGACGATCTTATTGGCTA-3' and b) antisense: 5'-GACCTCGAGTATTTTAAGAGCCTTTTGAGTG-3'. This process gives rise to a fragment of approximately 1062 base pairs that was cloned in the pGEMt vector, obtaining pGEMt MLT, which was confirmed by sequencing.

The results are presented in Figs. 1, 2, 3 and 4. Fig. 1 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No. 1) of the gene that codes for the soluble lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* (SLT70). Fig. 2 shows the amino acid sequence (SEQ ID No. 2) of the soluble lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis*. Fig. 3

shows the nucleotide sequence (SEQ ID No. 3) of the gene that encodes the membrane lytic transglycosidase protein of *P. salmonis* (MLT). Fig. 4 shows the amino acid sequence (SEQ ID No. 4) of the membrane lytic transglycosidase protein of *P. salmonis*

**Example 2:** Preparation of a vector for a genetic vaccine. Cloning of the genes of soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase of *P. salmonis* in the plasmid pUK21-A2.

The vector pUK21-A2 possesses the following characteristics necessary for use as DNA vaccine: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping the transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker.

a) Preparation of DNA of the plasmid pUK21-A2

Plasmid DNA obtained from *E. coli* HB 101 was purified using the commercial kit Qiagen Plasmid Purification (Qiagen) in accordance with the supplier's instructions. The plasmid was digested with the enzymes EcoRI and BamHI. Then the ends of the digested vector were dephosphorylated by adding 2  $\mu$ L of alkaline phosphatase (1 U/ $\mu$ L), then incubating

for 1 hour at 37°C. Finally the plasmid DNA prepared was purified using the "Wizard" system (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Fig. 5 shows a schematic representation of the plasmid pUK21-A2.

b) Cloning of the genes of soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase proteins of *P. salmonis* in the vector pUK21-A2.

For preparation of a vector containing the SLT70 gene for a genetic vaccine, 2 new primers are designed, which include the initial and final sequences of the SLT70 gene of *P. salmonis* as well as the sequences of specific sites for restriction endonucleases BamHI and EcoRI.

These primers are a) sense: 5'-CAGGGATCCGACATAATGCCATACTACTACTT-3' and b) antisense: 5'-CAGCTGCAGTTAAACACGCCTAATTCCAGCATT-3'. Identically, for preparation of a vector containing the MLT gene, the following primers were used a) sense: 5'-GACGGATCCATGTAGACGATCTTATTGGCTA-3' and antisense: 5'-GACGAATTCTATTTTAAGAGCCTTTTGAGTG-3'. Using these primers, a polymerase chain reaction is carried out using highly purified chromosomal DNA of *P. salmonis* (the same as that described in Example 1) as template. As a result, fragments are obtained that are isolated, and after digestion with the endonucleases BamHI and EcoRI they are joined to the plasmid pUK21-A2, generating the vaccine vectors pUK21-A2-SLT70 and



pUK21-A2 MLT. Fig. 6 shows a schematic representation of the plasmid containing the insert of the gene of the soluble lytic transglycosidase of *P. salmonis* and Fig. 7 shows the same for the gene of the membrane transglycosidase of *P. salmonis*.

**Example 3:** Development of antibodies in mice after intramuscular injection of the plasmids pUK21-A2-SLT70 and pUK21-A2-MLT.

The plasmids that contain the gene of SLT70 and of MLT in an animal expression vector, designated pUK21A2-SLT70 and pUK21A2-MLT, after injection in mouse muscle are capable of expressing this protein and developing an immune response that gives rise to the appearance of antibodies. This is demonstrated as follows. A solution of each of the plasmids is prepared in PBS buffer at a DNA concentration of  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Mice belonging to the Balb/c strain are injected in the femoral muscle of the hind limbs with 2 doses of  $100 \mu\text{l}$  of a solution of  $50 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  of plasmid DNA ( $50 \mu\text{l}$  is injected in each limb). This injection is performed on day zero and a second dose is administered at 15 days (day 15). As control, the same operation is carried out using control plasmid DNA that does not possess the genes of SLT or of MLT (pUK21-A2).

After 45 days have passed (day 45), blood is taken from the mice and the serum is analyzed for the presence of

antibodies to the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase by ELISA.

a) Determination of antibodies to the soluble lytic transglycosidase and membrane lytic transglycosidase by ELISA

The mice immunized on days 0 and 15 with the plasmids pUK21A2 and pUK21A2-SLT70 and pUK21A2-MLT are bled on day 45, with a cut in the inferior caudal vein of the tail. The 250  $\mu$ l of blood obtained is incubated at 37°C for one hour to obtain the serum. The same procedure of bleeding and obtaining the serum is also performed before immunization. This sample is called pre-immune serum.

The humoral immune response of the immunized mice with the plasmids is evaluated by ELISA, as described below.

1. 96-well polystyrene plates, treated beforehand with a bioadhesive phenolic protein (Pegotin), are activated with 10  $\mu$ g/ml of antigen, 50  $\mu$ l/well. They are incubated for 90 min at room temperature.
2. The antigen is removed and the nonspecific sites are blocked with a 4% solution of casein sucrose, 300  $\mu$ l/well for 60 min at room temperature.
3. 50  $\mu$ l of a serial dilution of the serum from the immunized mice and pre-immune serum is added to each well. It is incubated for 90 min at room temperature.

4. The serum samples are removed and the plate is washed with 300  $\mu$ l/well of phosphate saline buffer, containing Tween 20 at 0.02%. This is done 3 times, with intervals of 5 min between each washing cycle.

5. The solution from the last washing is removed and 50  $\mu$ l of mouse anti- immunoglobulin G goat antibody, combined with alkaline phosphatase, at the dilution recommended by the manufacturer in blocking solution, is added to each well. It is incubated for 30 min at room temperature, then proceeding as in point 4.

6. The solution from the last washing is removed and 50  $\mu$ l of a solution containing 1 mg/ml of paranitrophenyl phosphate in Tris 100 mM buffer, sodium chloride 100 mM and magnesium chloride 5 mM (pH 9.5) is added to each well. It is incubated for 30 minutes at 37°C.

7. After stopping the reaction with 3M sodium hydroxide, spectrophotometer readings are taken at a wavelength of 405 nm.

As shown by the results in Table 1, the serum from the mice injected with the plasmid pUK21A2-SLT70 reacts with the soluble lytic transglycosidase protein in ELISA, indicating that it contains specific antibodies to this protein. The same result is obtained with pUK21A-MLT. In contrast, the mice injected with a control preparation (pUK21A2) do not develop antibodies to the soluble lytic transglycosidase. This example shows that by injecting genes

of soluble lytic transglycosidase, prepared as described in this invention, it is possible to stimulate the immune system of the mouse and develop a humoral response in the form of anti-soluble lytic transglycosidase antibodies.

Table I. Measurement of anti-soluble and membrane lytic transglycosidase antibodies of *P. salmonis* in mice immunized with pUK21A2-SLT70 and pUK21A2-MLT.

Sample	O.D. reading 405 nm/30 min	
Preimmune serum	0.04	
Serum from mouse immunized with pUK21A2 (control)	0.05 *	
Serum from mouse immunized with pUK21A2-SLT70	0.32 *	
Serum from mouse immunized with pUK21A2-MLT	0.25 *	

\* Mean value for 4 different mice.

Example 4: Production of the recombinant proteins of the soluble lytic transglycosidase SLT70 of *P. salmonis* by cloning of the S1 and S2 segments of the SLT70 gene in the bacterial expression vector pET32a and its subsequent purification

After confirming the sequence of the gene that encodes the soluble lytic transglycosidase SLT70 of

*P. salmonis*, a segment S1 that codes for 182 amino acids in the aminoterminal region and the carboxyl terminal segment S2 of approximately 308 amino acids are amplified separately. This is because complete expression of SLT70 apparently is toxic to the cell, on account of its catalytic activity on peptidoglycan. The 547-bp segment S1 is isolated by PCR from genomic DNA by means of sense and antisense primers that contain the restriction sites EcoRI and XhoI, respectively, at their ends. These oligos are sense: 5'-CTCGAATTCAAGCAACTTACCAACTCTCTG-3' and antisense: 5'-GACCTCGAGTTACCAAGTTGTTCTAGCGCACG-3'. The same procedure is used for the 925bp segment S2, using the primers: sense 5'-CTCGAATTCGCTATCACCAAGAGCATTGCT-3' and antisense 5'-CAGCTCGAGTTAAACACGCCTAATTCCAGCATT-3'. Both PCR products are cloned in the vector pGEMT and the positive clones are identified by PCR and enzymatic digestion, obtaining the plasmids pGEMT-SLT70S1 and pGEMT-SLT70S2. The SLT70 gene is isolated from both clones by means of the enzymes EcoRI XhoI and and is purified by agarose gel electrophoresis. The purified genes are ligated using T4 phage ligase to the vector pET32a (Fig. 8) cut with EcoRI and XhoI. The positive clones are identified by digestion with these enzymes. Figs. 9 and 10 show the structure of the resultant plasmids pET32a-SLT70S1 and pET32a-SLT70S2. Plasmid DNA was obtained from each of the recombinant clones and was used for transforming competent cells of *E. coli*. Expression of the SLT70S1 and

SLT70S2 proteins is induced in a culture of recombinant cells by the action of 1 mM IPTG. Both recombinant proteins are present in the insoluble bacterial fraction and they are purified partially by successive washings with increasing concentrations of urea and subsequent dissolution in SDS 0.3%.

Fig. 13 shows a polyacrylamide gel with SDS made according to Laemmli (Laemmli, 1970), which shows the production of the soluble lytic transglycosidase proteins SLT70S1 and SLT70S2 of *P. salmonis* by recombinant bacteria transformed with the plasmids pET32a-SLT70S1 and pET32a-SLT70S2.

**Example 5:** Production of the recombinant proteins of the membrane lytic transglycosidase MLT of *P. salmonis* by cloning of segments S1 and S2 of the MLT gene in the bacterial expression vector pET32a and subsequent purification

After confirming the sequence of the gene that encodes the membrane lytic transglycosylase MLT of *P. salmonis*, the amino terminal segment S1 that codes for 167 amino acids and the carboxyl terminal segment S2 of approximately 207 amino acids are amplified separately. This expression of MLT is performed in segments because, just as for SLT70, overexpression of the complete catalytic enzyme is not feasible for the bacteria. The 500 bp segment S1 is

isolated by PCR from genomic DNA using sense and antisense primers that contain at their ends the restriction sites EcoRI and XhoI respectively. These oligos are sense 5'-GACGAATTCATGAGACGATCTTATTGGCTA-3' and antisense 5'-CAGCTCGAGTTATCACTGCGCCGCTTATAATC-3'. For the 621 bp segment S2 the same procedure is followed using the primers sense 5'-CTCGAATTCAATGTACTAACAACGTTAGCGT-3' and antisense 5'-GACCTCGAGTATTTTAAGAGCCTTTTGAGTG-3'. Both PCR products are cloned in the vector pGEMT and the positive clones are identified by PCR and enzymatic digestion, obtaining the plasmids pGEMT-MLTS1 and pGEMT-MLTS2. The MLT gene is isolated from both clones using the enzymes EcoRI and XhoI and are purified by agarose gel electrophoresis. The purified genes are ligated using phage T4 ligase to the vector pET32a (Fig. 8) cut with EcoRI and XhoI. The positive clones are identified by digestion with these enzymes. Figs. 11 and 12 show the structure of the resultant plasmids pET32a-MLTS1 and pET32a-MLTS2. Plasmid DNA was obtained from each of the recombinant clones and was used for transforming competent cells of *E. coli*. Expression of the proteins MLTS1 and MLTS2 was induced in a culture of recombinant cells by the action of 1 mM IPTG. Both recombinant proteins are present in the insoluble bacterial fraction and are purified partially, by successive washings with increasing concentrations of urea and then dissolution in SDS 0.3%.

Fig. 14 shows a polyacrylamide gel with SDS made according to Laemmli (Laemmli, 1970) that shows the production of the membrane lytic transglycosylase proteins MLTS1 and MLTS2 of *P. salmonis* by recombinant bacteria transformed with the plasmids pET32a-MLTS1 and pET32a-MLTS2.



## PATENT CLAIMS

1. DNA vaccine, which comprises a DNA fragment that codes for the soluble lytic transglycosidase (SLT70) protein or a fragment of DNA that codes for the membrane lytic transglycosidase (MLT) protein, both from *Piscirickettsia salmonis*, or an immunogenic region thereof, inserted in a suitable plasmid vector for expressing the corresponding protein and generating an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

2. DNA vaccine according to Claim 1, characterized in that it comprises a DNA fragment that codes for the soluble lytic transglycosidase (SLT70) protein of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof, inserted in a suitable plasmid vector for expressing the protein and generating an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

3. DNA vaccine according to Claim 2, characterized in that said DNA fragment corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 or a fragment thereof.

4. DNA vaccine according to Claim 2, characterized in that said DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 1, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism that is to be vaccinated.

5. DNA vaccine according to Claim 2, characterized in that said soluble lytic transglycosidase protein derived from *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 2 or an immunogenic region thereof.

6. DNA vaccine according to Claims 2 to 5, characterized in that said suitable plasmid vector has the following characteristics: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping the transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker.

7. DNA vaccine according to Claim 6, characterized in that said plasmid vector is the plasmid pUK21-A2 or some other with similar characteristics.

8. DNA vaccine according to Claims 2 to 7, characterized in that said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

9. DNA vaccine according to Claim 8, characterized in that said aquaculture species is the Coho salmon.

10. DNA vaccine according to Claim 8, characterized in that said aquaculture species is the Atlantic salmon.

11. DNA vaccine according to Claim 8, characterized in that said aquaculture species is the Chinook salmon.

12. DNA vaccine according to Claim 8, characterized in that said aquaculture species is the trout.

13. DNA vaccine according to Claims 2 to 13, characterized in that said vaccine is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular injection, spraying or dipping.

14. DNA vaccine according to Claims 2 to 12, characterized in that said vaccine additionally includes a suitable adjuvant.

15. DNA vaccine according to Claims 2 to 14, characterized in that said vaccine additionally includes a pharmaceutically acceptable carrier.

16. Method of detecting the presence of antibodies to soluble lytic transglycosidase of *P. salmonis* generated by the DNA vaccine according to Claims 2 to 15, characterized in that after a time blood is taken from the vaccinated vertebrate and the serum is analyzed for the presence of antibodies to soluble lytic transglycosidase of *P. salmonis*, by ELISA or some other method known in the prior art for the detection of antibodies.

17. Method of preparation of the DNA vaccine against *Piscirickettsia salmonis*, which comprises the following stages:

a) Cloning the DNA fragment that codes for the soluble lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof.

b) Inserting it in a suitable plasmid vector for expressing the protein and inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

18. Method according to Claim 17, characterized in that said DNA fragment corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 or a fragment thereof.

19. Method according to Claim 17, characterized in that said DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 1, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism that is to be vaccinated.

20. Method according to Claim 17, characterized in that said VacB virulence factor protein of *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 2 or an immunogenic region thereof.

21. Method according to Claims 17 to 20, characterized in that said suitable plasmid vector has the following characteristics: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping the transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker.

22. Method according to Claim 21, characterized in that said plasmid vector is the plasmid pUK21A2 or some other with similar characteristics.

23. Method according to Claims 17 to 22, characterized in that said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

24. Method according to Claim 23, characterized in that said aquaculture species is the Coho salmon.

25. Method according to Claim 23, characterized in that said aquaculture species is the Atlantic salmon.

26. Method according to Claim 23, characterized in that said aquaculture species is the Chinook salmon.

27. Method according to Claim 23, characterized in that said aquaculture species is the trout.

28. Method according to Claims 17 to 27, characterized in that said vaccine is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular injection, intraperitoneal injection, spraying or dipping.

29. Purified DNA segment to be used for the production of a vaccine against *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, which codes for the soluble lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof.

30. Purified DNA segment according to Claim 29, characterized in that it corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 or a fragment thereof.

31. Purified DNA segment according to Claim 29, characterized in that it corresponds to a nucleotide sequence equivalent to SEQ ID No. 1, in accordance with the genetic code or a fragment thereof.

32. Use of the purified DNA segment according to Claims 29 to 30, characterized in that it is used for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

33. Use of the purified DNA segment according to Claim 32, characterized in that said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

34. Use of the purified DNA segment according to Claim 33, characterized in that said aquaculture species is the Coho salmon.

35. Use of the purified DNA segment according to Claim 33, characterized in that said aquaculture species is the Atlantic salmon.

36. Use of the purified DNA segment according to Claim 33, characterized in that said aquaculture species is the Chinook salmon.

37. Use of the purified DNA segment according to Claim 33, characterized in that said aquaculture species is the trout.

38. Recombinant vaccine for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates produced using the DNA segment according to Claims 29 to 31, characterized in that the soluble lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof is produced using a suitable expression vector and a suitable host.

39. Recombinant vaccine according to Claim 38, characterized in that said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

40. Recombinant vaccine according to Claim 39, characterized in that said aquaculture species is the Coho salmon.

41. Recombinant vaccine according to Claim 39, characterized in that said aquaculture species is the Atlantic salmon.

42. Recombinant vaccine according to Claim 39, characterized in that said aquaculture species is the Chinook salmon.

43. Recombinant vaccine according to Claim 39, characterized in that said aquaculture species is the trout.

44. Recombinant vaccine according to Claims 38 to 43, characterized in that said expression vector is a plasmid or other DNA construct capable of expressing the soluble lytic transglycosidase protein in a suitable host.

45. Recombinant vaccine according to Claim 44, characterized in that said plasmid is the vector pET32a.

46. Recombinant vaccine according to Claims 38 to 45, characterized in that said host is a microorganism, an insect cell or an animal cell.

47. Recombinant vaccine according to Claim 46, characterized in that said host is preferably *E. coli*.

48. Recombinant vaccine according to Claims 38 to 47, characterized in that said vaccine is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular injection, intraperitoneal injection, spraying and dipping.

49. Recombinant vaccine according to Claims 38 to 47, characterized in that said vaccine additionally includes a suitable adjuvant.

50. DNA vaccine according to Claims 38 to 49, characterized in that said vaccine additionally includes a pharmaceutically acceptable carrier.

51. Method for detecting the presence of antibodies to the soluble lytic transglycosidase SLT70 generated by the recombinant vaccine according to Claims 38 to 50, characterized in that after a time blood is taken from the vaccinated vertebrate and the serum is analyzed for the presence of antibodies to soluble lytic transglycosidase by ELISA or some other method known in the prior art for the detection of antibodies.

52. DNA vaccine according to Claim 1, characterized in that it comprises a DNA fragment that codes for the membrane lytic transglycosidase (MLT) protein of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof, inserted in a suitable plasmid vector for expressing the protein and inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.



53. DNA vaccine according to Claim 52, characterized in that said DNA fragment corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 3 or a fragment thereof.

54. DNA vaccine according to Claim 52, characterized in that said DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 3, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism to be vaccinated.

55. DNA vaccine according to Claim 52, characterized in that said membrane lytic transglycosidase protein derived from *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 4 or an immunogenic region thereof.

56. DNA vaccine according to Claims 52 to 55, characterized in that said suitable plasmid vector has the following characteristics: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping the transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker.

57. DNA vaccine according to Claim 56, characterized in that said plasmid vector is the plasmid pUK21-A2 or some other with similar characteristics.

58. DNA vaccine according to Claims 52 to 57, characterized in that said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

59. DNA vaccine according to Claim 58, characterized in that said aquaculture species is the Coho salmon.

60. DNA vaccine according to Claim 58, characterized in that said aquaculture species is the Atlantic salmon.

61. DNA vaccine according to Claim 58, characterized in that said aquaculture species is the Chinook salmon.

62. DNA vaccine according to Claim 58, characterized in that said aquaculture species is the trout.

63. DNA vaccine according to Claims 52 to 62, characterized in that said vaccine is administered by appropriate methods, selected from the group comprising intramuscular injection, spraying or dipping.

64. DNA vaccine according to Claims 52 to 63, characterized in that said vaccine additionally comprises a suitable adjuvant.

65. DNA vaccine according to Claims 52 to 64, characterized in that said vaccine additionally comprises a pharmaceutically acceptable vehicle.

66. Method for detecting the presence of antibodies to membrane lytic transglycosidase of *P. salmonis* generated by the DNA vaccine according to Claims 52 to 65, characterized in that after a time blood is taken from the vaccinated vertebrate and the serum is analyzed for the presence of antibodies to membrane lytic transglycosidase of *P. salmonis* by ELISA or some other method known by a person skilled in the art for detecting antibodies.

67. Method of preparation of the DNA vaccine against *Piscirickettsia salmonis*, characterized in that it comprises the following stages:

a) Cloning the DNA fragment that codes for the membrane lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof

b) Inserting it in a suitable plasmid vector for expressing the protein and inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

68. Method according to Claim 67, characterized in that said DNA fragment corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 3 or a fragment thereof.

69. Method according to Claim 67, characterized in that said DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 3, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism to be vaccinated.

70. Method according to Claim 67, characterized in that said membrane lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 4 or an immunogenic region thereof.

71. Method according to Claims 67 to 70, characterized in that said suitable plasmid vector has the following characteristics: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site

for stopping transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker.

72. Method according to Claim 71, characterized in that said plasmid vector is the plasmid pUK21A2 or some other with similar characteristics.

73. Method according to Claims 66 to 72, characterized in that said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

74. Method according to Claim 73, characterized in that said aquaculture species is the Coho salmon.

75. Method according to Claim 73, characterized in that said aquaculture species is the Atlantic salmon.

76. Method according to Claim 73, characterized in that said aquaculture species is the Chinook salmon.

77. Method according to Claim 73, characterized in that said aquaculture species is the trout.

78. Method according to Claims 67 to 77, characterized in that said vaccine is administered by appropriate methods, selected from the group comprising intramuscular injection, intraperitoneal injection, spraying or dipping.

79. Purified DNA segment that can be used for the production of a vaccine against *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, characterized in that it codes for the membrane lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof.

80. Purified DNA segment according to Claim 79, characterized in that it corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 3 or a fragment thereof.

81. Purified DNA segment according to Claim 79, characterized in that it corresponds to a nucleotide sequence equivalent to SEQ ID No. 3, according to the genetic code or a fragment thereof.

82. Use of a purified DNA segment according to Claims 79 to 80, characterized in that it is used for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

83. Use of a purified DNA segment according to Claim 82, characterized in that said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

84. Use of a purified DNA segment according to Claim 83, characterized in that said aquaculture species is the Coho salmon.

85. Use of a purified DNA segment according to Claim 83, characterized in that said aquaculture species is the Atlantic salmon.

86. Use of a purified DNA segment according to Claim 83, characterized in that said aquaculture species is the Chinook salmon.

87. Use of a purified DNA segment according to Claim 83, characterized in that said aquaculture species is the trout.

88. Recombinant vaccine for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates produced using the DNA segment according to Claims 79 to 81, characterized in that the membrane lytic transglycosidase protein of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof is produced using an expression vector and a suitable host.

89. Recombinant vaccine according to Claim 88, characterized in that said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

90. Recombinant vaccine according to Claim 89, characterized in that said aquaculture species is the Coho salmon.

91. Recombinant vaccine according to Claim 89, characterized in that said aquaculture species is the Atlantic salmon.

92. Recombinant vaccine according to Claim 89, characterized in that said aquaculture species is the Chinook salmon.

93. Recombinant vaccine according to Claim 89, characterized in that said aquaculture species is the trout.

94. Recombinant vaccine according to Claims 88 to 93, characterized in that said expression vector is a plasmid or other DNA construct capable of expressing the membrane lytic transglycosidase protein in a suitable host.

95. Recombinant vaccine according to Claim 94, characterized in that said plasmid is the vector pET32a.

96. Recombinant vaccine according to Claims 88 to 95, characterized in that said host is a microorganism, an insect cell or an animal cell.


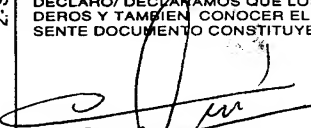
97. Recombinant vaccine according to Claim 96, characterized in that said host is preferably *E. coli*.

98. Recombinant vaccine according to Claims 88 to 97, characterized in that said vaccine is administered by suitable methods, selected from the group comprising intramuscular injection, intraperitoneal injection, spraying and dipping.

99. Recombinant vaccine according to Claims 88 to 97, characterized in that said vaccine additionally comprises a suitable adjuvant.

100. DNA vaccine according to Claims 88 to 99, characterized in that said vaccine additionally comprises a pharmaceutically acceptable vehicle.

101. Method for detecting the presence of antibodies to the membrane lytic transglycosidase generated by the recombinant vaccine according to Claims 88 to 100, characterized in that after a time blood is taken from the vaccinated vertebrate and the serum is analyzed for the presence of antibodies to membrane lytic transglycosidase by ELISA or some other method known by a person skilled in the art for detecting antibodies.

22 FECHA DE SOLICITUD		 <b>REPUBLICA DE CHILE</b> MINISTERIO DE ECONOMIA FOMENTO Y RECONSTRUCCION SUBSECRETARIA DE ECONOMIA DEPTO. PROPIEDAD INDUSTRIAL	11 NUMERO DE PRIVILEGIO
DIA MES AÑO			21 NUMERO DE SOLICITUD <b>1048-2003</b>
DIA MES AÑO			
12 TIPO DE SOLICITUD		PRIORIDAD: TIPO	ESTADO
<input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCIÓN <input type="checkbox"/> PATENTE DE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> TRANSFERENCIA <input type="checkbox"/> CAMBIO DE NOMBRE <input type="checkbox"/> LICENCIA		<input type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCIÓN <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL	<input type="checkbox"/> CONCEDIDA <input type="checkbox"/> EN TRAMITE
		31 N°: 33 PAÍS: 32 FECHA:	
DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS			
<input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA <input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS <input type="checkbox"/> PODER <input type="checkbox"/> CESION <input type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD <input type="checkbox"/> PROTOTIPO			
<input type="checkbox"/> CERTIFICADA <input type="checkbox"/> TRADUCIDA AL ESPAÑOL			
TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD			
<b>"VACUNA CONTRA EL SINDROME RICKETTSIAL DEL SALMON BASADA EN FRAGMENTOS DE ADN QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEINAS TRANSGLICOSIDASAS LITICAS SOLUBLE (SLT70) Y TRANSGLICOSIDASAS LITICAS DE MEMBRANA (MLTB) DE PISCIRICKETTSIA SALMONIS O UNA REGION INMUNOGENICA DE ESTAS"</b>			
71 SOLICITANTE(S): (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, PAIS, TELEFONO)			
FUNDACION CIENCIA PARA LA VIDA AV. MARATON 1943, NUÑO A, SANTIAGO, CHILE Y FUNDACION CHILE AV. PARQUE Antonio Rabat Sur 6165, VITAURO, SANTIAGO, CHILE			
72 INVENTOR O CREADOR: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - NACIONALIDAD)			
VALENZUELA, VALDES, Pablo; BURZIO, ERIZ, Luis; ROSEMBLATT, SILBER, Mario CHILENOS			
74 REPRESENTANTE: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, TELEFONO)			
<del>BIOTECNOLOGIAS DEL AGUA LTDA. Y/O DAVOR COTORAS Y/O PABLA VIEDMA</del> <del>ANIBAL ARACENA 571, NUÑO A, SANTIAGO, CHILE, TEL. 2393822</del>			
ESTUDIO HARNECKER Av. Isidora Goyenechea 3250 - 3er. Piso Santiago - CHILE			
DECLARO/ DECLARAMOS QUE LOS DATOS QUE APARECEN EN LOS RECUADROS DE TONO ROSADO SON VERDADEROS Y TAMBIEN CONOCER EL ART. 44 DE LA LEY N° 19.039 SOBRE PROPIEDAD INDUSTRIAL Y QUE EL PRESENTE DOCUMENTO CONSTITUYE UNA SOLICITUD FORMAL.			RECEPCION
FIRMA Y R.U.T. REPRESENTANTE  78.365.180-7			FIRMA Y R.U.T. SOLICITANTE

INSTRUCCIONES:

1.- LLENE SOLAMENTE LOS RECUADROS DE TONO ROSADO CON CARACTERES NEGROS DE MAQUINA (NO MANUSCRITO)  
2.- SE ENTIENDE POR PRIORIDAD AQUELLA PROTECCION SOLICITADA O CONCEDIDA ANTERIORMENTE POR EL MISMO INVENTO, GENERALMENTE EN EL EXTRANJERO

ORIGINAL







(11) REPUBLICA DE CHILE  
MINISTERIO DE ECONOMIA  
FOMENTO Y RECONSTRUCCION  
SUBSECRETARIA DEL COMERCIO



DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(11) N° REGISTRO

(12) TIPO DE Solicitud

☒ INVENTIVA

MODELO DE UTILIDAD

☐ PRECATORIAL

☐ MEJORA

☐ REVALUA

(13) Fecha de presentación

(15) Int. Cl. 8

(17) Número de Solicitud

(22) Fecha de Solicitud

(30) Número de Propiedad (para el y fecha)

(72) Nombre inventor(es) (indicar dirección)

(71) Nombre Solicitante (indicar dirección y tel.)

FUNDACION CIENCIA PARA LA VIDA  
Av. Marathon 1943, Ñuñoa, Santiago, Chile  
FUNDACION CHILE, Av. Parque Antonio  
Rabat Sur 6165, Vitacura, Santiago, Chile

VALENZUELA, VALDÉS, Pablo; BURZIO, ERIZ,  
Luis y ROSEMBLATT, SILBER, Mario, Chilenos.  
Av. Marathon 1943, Ñuñoa, Santiago, Chile

(74) Representante (indicar dirección y teléfono)

Biotechnologías del Agua Ltda. y/o Davor Cotoras y/o  
Pabla Viedma, Aníbal Aracena 571, Ñuñoa, Chile  
Tel. 2393822

(54) Título de la invención (máximo 330 caracteres)

Vacuna contra el síndrome rickettsial del salmón basada en fragmentos de ADN que codifican para las proteínas transglicosidasa lítica soluble (SLT70) y transglicosidasa lítica de membrana (MLTB) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de éstas.

(57) Resumen (máximo 1600 caracteres)

Una vacuna de ADN para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, especialmente en especies de acuicultura, tales como el salmón Coho (*Oncorhynchus kitsuch*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), el salmón Chinook (*O. tshawytscha*) o la trucha (*O. mykiss*), basada en un fragmento de ADN que codifica para las proteínas transglicosidasa lítica soluble y/o transglicosidasa lítica de membrana. El procedimiento de preparación de esta vacuna de ADN contra *Piscirickettsia salmonis*, que comprende las siguientes etapas: a) Clonar el fragmento de ADN que codifica para las proteínas transglicosidasa lítica soluble (SLT70) y transglicosidasa lítica de membrana (MLT) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta. b) Insertarlo en un plásmido vector adecuado para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

La invención también describe la utilización de este fragmento de ADN en la producción de una vacuna genética contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados y una vacuna basada en una proteína recombinante preparada a partir de este fragmento.



## TITULO

Vacuna contra el síndrome rickettsial del salmón basada en fragmentos de ADN que codifican para las proteínas transglicosidasa lítica soluble (SLT70) y transglicosidasa lítica de membrana (MLTB) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de éstas.

## RESUMEN

Una vacuna de ADN para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, especialmente en especies de acuicultura, tales como el salmón Coho (*Oncorhynchus kitsuch*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), el salmón Chinook (*O. tshawytscha*) o la trucha (*O. mykiss*), basada en un fragmento de ADN que codifica para las proteínas transglicosidasa lítica soluble y/o transglicosidasa lítica de membrana. El procedimiento de preparación de esta vacuna de ADN contra *Piscirickettsia salmonis*, que comprende las siguientes etapas: a) Clonar el fragmento de ADN que codifica para las proteínas transglicosidasa lítica soluble (SLT70) y transglicosidasa lítica de membrana (MLT) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta. b) Insertarlo en un plásmido vector adecuado para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

La invención también describe la utilización de este fragmento de ADN en la producción de una vacuna genética contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados y una vacuna basada en una proteína recombinante preparada a partir de este fragmento.



## MEMORIA DESCRIPTIVA

### Campo de la invención.-

La presente invención se refiere a una vacuna de ADN para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, especialmente en especies de acuicultura, tales como el salmón Coho, el salmón del Atlántico, el salmón Chinook o la trucha, basada en un fragmento de ADN que codifica para las proteínas transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis*, y su procedimiento de preparación. La invención también describe un segmento de ADN útil en la producción de una vacuna contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados y una vacuna basada en una proteína recombinante preparada a partir de este oligonucleótido

## ANTECEDENTES

### Descripción de lo conocido en la materia

#### SÍNDROME RICKETTSIAL DEL SALMON (SRS)

La bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis*, causante de la enfermedad llamada Síndrome Rickettsial del Salmon (SRS), ha sido desde un poco antes de su identificación (Fryer y col., 1990) un creciente problema para la industria salmonera chilena. Lo que inicialmente se describía como una patología que afectaba sólo al salmón Coho, se extendió a la trucha y al salmón del Atlántico. Pero, no solamente la extensión de la enfermedad a las otras especies salmónidas cultivadas en el país fue la causa del empeoramiento de la situación, sino que durante la década pasada esta enfermedad fue adquiriendo más fuerza y año tras año, las mortalidades relacionadas a ella, los costos en tratamiento y los efectos en la productividad y en la calidad del producto final han aumentado.

Las medidas de mitigación de la enfermedad utilizadas en los centros de cultivo hoy en día están basadas principalmente en el tratamientos con antibióticos y otras medidas de manejo tales como la aplicación de periodos de descanso entre ciclos productivos, para así evitar la transmisión horizontal, en el uso de algunos inmunoestimulantes disponibles en el mercado, y en la limitación de la transmisión vertical, a través de costosos procedimientos de selección de reproductores. En ausencia de vacunas



Todos estos procedimientos no están totalmente desarrollados, ni totalmente incorporados a las metodologías de producción, y en algunos casos no son aplicados completamente o correctamente. Todo esto se suma a la aparición de cepas de *Piscirickettsia* de mayor virulencia, y la interacción con las otras enfermedades bacterianas, virales y parasitarias que se han ido agregando año a año a la lista de enfermedades con las que el acuicultor debe lidiar. Esto explica que la situación sólo haya ido empeorando a través de los años.

El Síndrome Rickettsial del Salmón sigue sin una solución sólida. Los tratamientos con antibióticos se están haciendo cada vez menos efectivos. Su aplicación exitosa es incierta y sólo hay respuesta cuando se aplican muy tempranamente y, en muchos casos, el suministro inyectable del antibiótico es la única solución factible. En el mediano plazo, la única solución viable será la utilización de vacunas para la inmunización de los peces, previo a su exposición a las condiciones de cultivo marino, donde la propagación horizontal de la enfermedad es muy eficiente, ya que la sobrevivencia de la bacteria en agua dulce es muy baja.

3



a la vacunación, y a ciertas adherencias peritoneales, que podrían afectar la calidad y/o el crecimiento de los peces. La última generación en vacunas son las de ADN, que consisten en la inyección de cantidades mínimas de material genético que codifique antígenos específicos del patógeno. De esta manera, el huésped comienza a producir *in-situ* los antígenos codificados. El material genético introducido tendrá una vida media de unos días, después de lo cual desaparece, tras cumplir su función.

## ANÁLISIS DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

### VACUNAS EN ACUICULTURA, VACUNAS PARA SRS

#### Antecedentes generales

En la actualidad, la industria salmonera nacional se ha consolidado como una importante fuente de divisas para el país, generando empleo y permitiendo el surgimiento de otras empresas relacionadas con el sector. En 1998, la producción neta nacional de salmónes y truchas alcanzó un volumen de 181.600 toneladas, generando divisas por un monto de US\$ 713,5 millones (ver Salmonoticias Nº 72; pág. 4-6; 1999). Sin embargo, esta actividad no ha estado exenta de problemas, a la acusación de dumping y a la brusca caída del mercado japonés, principal destino del salmón chileno, hay que sumar las pérdidas económicas que se producen debido a la muerte de los salmónes. La mortalidad de los salmónes en cautiverio se debe a diversos factores, entre los cuales se pueden mencionar la acción de la fauna depredadora, malos procedimientos sanitarios, y la alta densidad de peces por jaulas. No obstante, son las enfermedades, y principalmente las causadas por agentes infecciosos, las que se destacan por provocar pérdidas masivas (ver Salmonoticias Nº 71; pág. 12-13 y Nº 72; pág. 18-19; 1999). Actualmente los ejemplares producidos en Chile, se encuentran asediados principalmente por microorganismos tales como *Renibacterium salmoninarum*, agente causante de BKD (Bacterial Kidney Disease) y otro de naturaleza rickettsial como la *Piscirickettsia salmonis* que es el agente causante del síndrome rickettsial de salmonídeos, patología que sin duda ha provocado las mayores pérdidas a la industria salmonera en Chile. La cantidad de dinero que se pierde debido a esta enfermedad se ha evaluado en más de US\$ 100 millones anuales, si se incluyen tanto los costos directos en términos de mortalidades, tratamiento, alimentación, así como la pérdida de ganancias potenciales (Obach A., y cols., 1998). Otro agente infeccioso que **está causando problemas en este sector es un virus perteneciente al género Birnaviridae** conocido como Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) (Bruno D., y Poppe T., 1996). Este virus posee un ARN de doble hebra y que provoca un serio



cuadro clínico en los peces infectados, produciendo sustanciales mortalidades (Bustos P., y cols., 1999). Más recientemente, existe temor sobre la aparición de otro virus causante de la anemia infecciosa de salmones o ISAV (ver Salmonoticias Nº 71; pág. 11; 1999 y Cassigoli J., 1999). Finalmente los agentes micóticos, tales como los pertenecientes al género *Saprolegnia*, también son una constante amenaza a todas las especies de salmonídeos cultivados en Chile (Enríquez R., 1999).

El Síndrome Rickettsial del Salmón se presentó por primera vez en el año 1989 en el sur de Chile y fue reportada en salmones Coho (*Oncorhynchus kitsutch*), pero luego se encontró que también afectaba al salmón Atlántico (*Salmo salar*), salmón Chinook (*O. tshawytscha*), trucha arcoiris (*O. mykiss*), entre otras especies de salmonídeos (Bravo y Campos, 1989). Los signos clínicos que caracterizan a un pez afectado con Síndrome Rickettsial son el nado en la superficie del agua, letargia, anorexia, orillamiento, choque contra las paredes de las jaulas y oscurecimiento de la piel. Las lesiones macroscópicas externas más relevantes incluyen descamación, palidez branquial, hemorragias equimóticas y petequias en la base de las aletas, nódulos y úlceras en la piel, y los niveles de hematocrito reflejan una severa anemia (Elizalde J., 1993). Mediante análisis anatomopatológico de la cavidad abdominal, es frecuente encontrar la presencia de líquido ascítico, reno y esplenomegalia, nódulos blanquecinos en el hígado, presencia de una pseudomembrana en el corazón y hemorragias petequiales en el estómago, intestino, vejiga natatoria, muscular y grasa visceral. En la mayoría de los casos, el intestino está lleno con un contenido mucoso amarillento y el estómago con un líquido transparente seromucoso. Desde el punto de vista histopatológico las lesiones principales corresponden a necrosis en diversos órganos y tejidos, siendo los más afectados el riñón, hígado, intestino y cerebro. Además se puede encontrar macrófagos conteniendo microorganismos dentro del citoplasma (Larenas y cols., 1998).

El agente etiológico de este síndrome, fue identificado por primera vez en 1990 por Fryer (Fryer y col., 1990); pero sólo en 1992 se pudo establecer de modo más específico la relación de esta bacteria con otras especies de rickettsias, determinando mediante la secuencia del gen del ARN 16S el origen de un nuevo género y una nueva especie que se denominó *Piscirickettsia salmonis* (ATCC UR 1361) (Fryer y col., 1992; Fryer, 1997). La bacteria se caracteriza por ser Gram negativa, pleomórfica, inmóvil, no encapsulada, cocoide, con un tamaño variable entre 0,5 -1,5  $\mu\text{m}$ . En cultivo, este patógeno sólo crece en líneas celulares de salmón, tal como células CHSE-214, dentro de vacuolas citoplasmáticas asociada a otras formando agregados de bacterias, aunque también se ha observado como argollas aisladas. Presenta tinción con reactivo de



Giemsa, Hematoxilina-Eosina, Azul de metileno, entre otros. Mediante microscopía electrónica se ha podido observar que esta bacteria presenta dos membranas, una externa ondulada y una interna citoplasmática, lo cual se ha observado en otros agentes rickettsiales. Mediante esta misma técnica, se ha podido demostrar la presencia de estructuras similares a ribosomas cerca de la membrana plasmática, un ADN fibrilar en la región central y estructuras esféricas electrondensas (Larenas y col., 1998).

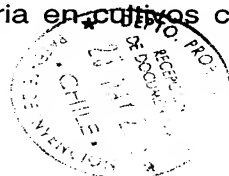
#### Medidas de prevención

En la actualidad el SRS ha sido controlado parcialmente mediante el uso de antibióticos los cuales no han resultado ser totalmente efectivos en el combate de la enfermedad. Entre los antibióticos con mejores perspectivas para el tratamiento del SRS, están las quinolonas, por su amplio espectro, baja CMI y acción intensamente bactericida. Sin embargo, estos fármacos tienen efectos colaterales, tales como la generación de resistencia de los patógenos, toxicidad, hipersensibilidad e inmunosupresión (Arriagada R., 1996). El uso de antibióticos tiene problemas que se relacionan con regulaciones aprobadas en 1997 por la FDA de los Estados Unidos de Norteamérica y por la Comunidad Económica Europea que exigirán que todos los productos provenientes de la acuicultura deberán llegar a sus respectivos mercados sin residuos de antibióticos. Esto sin duda que será un problema para los productores chilenos si se piensa que en Chile se destina el 80 % de los antibióticos disponibles en el mercado nacional al combate de la *P. salmonis* (ver Aquanoticias N° 37; pág. 20; 1997).

#### Bacterinas y vacunas a base de proteínas recombinantes.

Recientemente, Smith y col., (1997) describieron los resultados de protección parcial obtenidos al inmunizar salmónes Coho con una bacterina clásica para *P. salmonis*, preparada con la cepa ATCC del patógeno crecido en células CHSE-214 y posteriormente fijado con paraformaldehído. Los peces fueron desafiados en forma natural, esto es transfiriéndolos luego de la esmoltificación a un sitio con piscirickettsiosis endémica.

Gaggero presentó en 1995 una solicitud de Patente Chilena (Gaggero 1995) referida a un procedimiento de obtención de una vacuna contra el síndrome rickettsial del salmón producido por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. El método descrito en esa solicitud de patente comprende un proceso de producción de una vacuna inactivada, del tipo bacterina. Para ello inicialmente debe propagarse la bacteria en cultivos celulares de



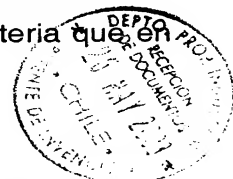
peces y una vez purificada, se inactiva y se diluye en un disolvente adecuado, quedando lista para su uso inyectable.

Otra posibilidad son las vacunas basadas en proteínas recombinantes. Si se logra identificar antígenos involucrados en la respuesta inmune humoral y/o celular de salmonídeos contra *P. salmonis*, es posible, usando la metodología de Biología Molecular, clonar y expresar estas moléculas en vectores apropiados, ya sea en bacterias, levaduras o células animales, para posteriormente estudiar su carácter protector. Este tipo de procedimientos ha sido empleado en el estudio de numerosas patologías que afectan a los humanos y entre ellas, algunas de las enfermedades que son provocadas por bacterias del género *Rickettsia*.

En el caso de la fiebre de los matorrales, producida por la *R. tsutsugamushi*, se ha determinado la presencia de dos polipéptidos, de masas moleculares de 56 y 58 Kd, localizados en la superficie de la bacteria, los que serían predominantes en la infección (Tamura y col., 1985) y cuyos genes han sido clonados (Stover y col., 1990a). En el caso de la fiebre de la Montañas Rocosas, producida por la *R. rickettsii*, se ha identificado y clonado el gen para una proteína de 155 KD, localizada en la pared celular de la bacteria y mediante anticuerpos monoclonales se ha determinado la presencia de epítomos sensibles al calor. Este antígeno, al ser inoculado en ratones, los protege del efecto letal de la bacteria (McDonald y col., 1987). Es interesante destacar, que una proteína análoga de 155 Kd, ha sido identificada en *Rickettsia conorii* y el gen que la codifica se ha clonado y expresado en *E. coli*. Al inocular cobayos con un lisado de la bacteria recombinante, se obtiene protección a la infección con la cepa homóloga de *Rickettsia conorii* y también protección parcial a la infección experimental con una cepa heteróloga como es *Rickettsia rickettsii* (Vishwanath y col., 1990).

#### Vacunas de ADN

El desarrollo de nuevas estrategias de vacunación contra *P. salmonis* se justifica por el hecho de que a la fecha la enfermedad no ha sido controlada y sólo existe una vacuna comercial tipo bacterina con registro al día, pero cuyos resultados son controversiales para los expertos en salud animal abocados al tema del SRS (ver Aquanoticias Nº 47; pág. 7; 1999). Existen varias vacunas en etapa experimental, cinco de ellas son del tipo bacterinas, una proteína aislada (antígeno purificado) y una basada en ADN recombinante (ver Aquanoticias Nº 47; pág. 9; 1999). La producción de una vacuna tipo bacterina, involucra el cultivo, la purificación y posterior inactivación de la bacteria. El proceso de cultivo puede tomar hasta 2 semanas cuando no hay problemas de contaminación, hecho que no es trivial cuando se trata de cultivar una bacteria que en





cultivo celular es prácticamente sensible a todos los antibióticos. El proceso de purificación es costoso, lento e inadecuado para un escalamiento como el que se requeriría para una vacunación masiva de millones de salmones. También se ha demostrado que una vacunación con bacterinas requiere de adyuvantes para la potenciación de la respuesta inmune del pez y de dosis adicionales de refuerzo, situación que produce rechazo en los salmicultores porque implica una doble manipulación de los peces lo cual puede generar un estrés tan alto que puede provocar mortalidades mayores a las que se pueden producir con un posible brote de SRS (ver Aquanoticias N° 47; pág. 8; 1999). Además, no se conocen trabajos en que se demuestre que las bacterinas son capaces de inducir inmunidad celular, lo cual es muy importante cuando se trata de patógenos de vida intracelular como lo es *P. salmonis*. Por otro lado, vacunar con antígenos puros también plantea problemas, entre ellos se puede mencionar el hecho de que por tratarse de proteínas usualmente obtenidas a partir de ADN recombinante son clonadas y expresadas en microorganismos, generalmente producidas dentro de cuerpos de inclusión, desde donde deben recuperarse y purificarse, proceso que toma tiempo y eleva los costos de producción. Las proteínas además, una vez que son obtenidas deben mantenerse en frío para su óptimo funcionamiento, y este último hecho las hace poco viables en regiones donde se carece de sistemas de cadena de frío. Otros sistemas de vacunación, tales como los basados en vectores virales presentan el inconveniente de que pueden ser ineficientemente atenuados y revertir hacia una cepa virulenta (Hilleman R., 1995). Además, debido a que requieren integrarse al genoma del huésped pueden provocar mutaciones indeseables (Kurth R., 1995).

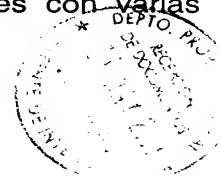
La tecnología de vacunación con ácidos nucleicos se refiere al procedimiento mediante el cual se induce una respuesta inmune a una proteína expresada "*in vivo*" luego de la introducción de una secuencia oligonucleotídica que codifica para esta proteína. Esta tecnología es radicalmente diferente a las vacunas clásicas que contienen el material inmunogénico, ya sea en la forma de un agente patogénico inactivado o más recientemente como una subunidad del agente patogénico, sea este purificado a partir del patógeno o producido por ADN recombinante o mediante síntesis química de péptidos. La posibilidad de desarrollar vacunas basadas en ácidos nucleicos nació en 1990 cuando Felgner y sus colaboradores (Wolff y cols., 1990; Felgner y col., 1995) describieron que la inyección de genes reporteros en células musculares, resultaba en la expresión de las proteínas codificadas por el material genético. Dos años más tarde Tang y colaboradores (Tang y cols., 1992) demostraron que la inmunización de animales con microesferas de oro coloidal recubiertas con ADN plasmidial resultaba en



la aparición de una respuesta inmunogénica de los animales hacia las proteínas codificadas por el ADN inyectado. Posteriormente Liu y colaboradores (Ulmer y cols., 1993) demostraron que la inmunización de los animales con ADN codificador de proteínas del virus de la influenza inducían una inmunidad protectora contra el patógeno. En esos experimentos los ratones fueron inmunizados con ADN plasmidial que contiene un inserto codificador de las proteínas del virus, los cuales desarrollaron una respuesta inmune humoral y celular suficiente para proteger a los animales de un desafío letal con el virus influenza. Recientemente, varios investigadores han reportado la eficacia de las inmunizaciones con ADN para provocar respuestas inmunes protectoras en modelos animales de varias enfermedades infecciosas algunas de las cuales incluyen patógenos intracelulares como *P. salmonis*. Entre estas se incluyen influenza (Ulmer y cols., 1993; Montgomery y cols., 1993; Robinson y cols., 1993), (Xiang y cols., 1994), malaria (Sedegah y cols., 1994; Hoffman y cols., 1995), leishmaniasis (Xu y cols., 1994), virus papiloma (Donnelly y cols., 1995), herpes (McClements, 1995; Rouse, 1995), tuberculosis (Lozes E. y cols; Lowrie D., y cols. 1997) y virus herpes de bovino (Babiuk y cols., 1995).

Las vacunas de ácidos nucleicos pueden estar basadas en ARN o en ADN, aunque la gran mayoría de los estudios realizados en animales hasta hoy en día se han basado en ADN. A pesar de que el ARN mensajero es sin duda más atractivo desde el punto de vista de la baja posibilidad de integración en el genoma, no parece ser el vehículo de preferencia debido a su inestabilidad y mayor dificultad de producción.

Dos factores deben tomarse en cuenta al considerar que tipo de tejido es el óptimo para inmunizaciones con vacunas de ADN, como son el nivel de antígeno expresado y la accesibilidad del antígeno al sistema inmune. La cantidad de antígeno producido dependerá de la cantidad de ADN incorporada a las células, la cual a su vez depende del tipo de células y de la formulación del ADN. El nivel de expresión dependerá en parte de la actividad o potencia del promotor y de otros elementos genéticos que optimicen la transcripción y la traducción presente en el vector. Para un mismo promotor, esta actividad puede variar en diferentes tejidos. Los vectores de expresión poseen un promotor eficiente, los cuales son usualmente promotores virales tales como los del Citomegalovirus humano, Virus de simios 40 (SV40), Virus del Sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores no son tejido específico, tienen expresión constitutiva, y pueden ser sustituidos por elementos promotor/enhancers especie y tejido-específicos como es el caso del gen de la  $\beta$ -actina de carpa *Cyprinus carpio* (Liu Z. y col., 1990). Además, de una región que contiene secuencias para múltiples cortes con varias



enzimas de restricción, los vectores poseen un sitio de poliadenilación, para aumentar la estabilidad del ARNm. Con este fin, usualmente se usa la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento de bovino, BGHpA (Donnelly J., y cols., 1997). También deben poseer un origen de replicación procariótico, para la eficiente propagación del plasmidio en células de *E. coli* competentes. Los marcadores de selección más usuales que llevan los vectores de expresión plasmidiales utilizados en vacunas de ADN son Ampicilina o Kanamicina. Experimentalmente se ha encontrado que si entre la región promotora y la secuencia de poliadenilación se coloca un intrón (secuencia no codificante) se aumenta varias veces la eficiencia de expresión del vector (Barry M., y Johnston S., 1977).

La accesibilidad del antígeno al sistema inmune es otra variable importante y que dependerá de su presentación. Para inducir una respuesta de tipo humoral, el antígeno deberá ser presentado en la superficie de la célula transfectada con el ADN o secretada y procesada por células presentadoras de antígeno, lo cual dependerá del tipo de vector utilizado. Para provocar una respuesta celular, deberá inducirse una presentación adecuada de péptidos derivados del antígeno por moléculas codificadas por el MHC del sistema hospedero. (Donnelly J., y cols., 1997), (Sewell A., y cols., 1999; Whitton J., y cols., 1999).

La transferencia de ácidos nucleicos al animal o individuo vacunado puede ser llevada a cabo de varias maneras. La formulación más comúnmente usada es la transferencia de ADN plasmidial o de ADN contenido en un vector viral (adenovirus, retrovirus, vaccinia, herpes, etc.). El ADN plasmidial ofrece varias ventajas potenciales ya que es muy estable y más fácil de preparar en forma reproducible. Además, en contraste con los vectores virales, el ADN plasmidial está usualmente diseñado para permanecer en forma episomal, es decir, sin capacidad para integrarse al genoma del animal. Muchos de los vectores virales en general requieren de integración al genoma lo que podría resultar en activación de oncogenes o en inactivación de genes supresores de tumores. (Nichols y cols., 1995). Una de las rutas de inmunización con ADN más estudiadas ha sido la inyección directa de material genético al tejido muscular. Por ejemplo, Davis y colaboradores (Davis y cols., 1993) han demostrado que una sola inyección de ADN codificador del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, en músculo esquelético de ratón, induce una rápida, potente y sostenida respuesta inmune humoral y celular. A pesar de la baja eficiencia de la transferencia genética en músculo maduro, ésta es suficiente para los propósitos de inmunización. Por ejemplo, una inyección de solo 10 microgramos de ADN en el músculo de la tibia anterior de ratón, induce anticuerpos en



un nivel superior a las 10 mIU/mL, nivel considerado suficiente para conferir inmunidad protectora en humanos (Davis y cols., 1993). Se ha observado que la potencia de la respuesta inmunológica está claramente relacionada con la dosis de la vacuna y con la eficiencia de la transfección. Así, métodos que mejoran la incorporación de ADN a las células mejoran la respuesta inmunológica. Por ejemplo, la inyección de ADN en 25% sacarosa resulta en un aumento de cien veces en el nivel de anticuerpos (Davis y cols., 1993). Estos autores también han demostrado que la respuesta inmune obtenida como resultado de inmunización por ADN es persistente, demostrándose que el nivel de anticuerpos obtenido se mantiene por lo menos por 17 semanas luego de una sola inyección de ADN.

Una variación tecnológica muy interesante ha sido descrita recientemente por Johnston y colaboradores (Barry y cols., 1995; Johnston y Barry, 1997). Estos autores desarrollaron un método para la obtención de vacunas de ADN, basado en la inmunización con genotecas de expresión, las que potencialmente codifican todas las proteínas del agente infeccioso. Esto permite desarrollar vacunas incluso contra patógenos sobre los cuales se conoce muy poco de antígenos protectivos, ya que no es necesario saber que genes del patógeno están asociados a inmunidad. Barry y colaboradores demostraron que la inmunización de ratones con genotecas de expresión obtenidas a partir de ADN genómico completo de *Mycoplasma pulmonis*, un patógeno natural de roedores, era capaz de desarrollar inmunoprotección contra un desafío con el patógeno. Esta tecnología se basa en que todos los antígenos del patógenos están codificados finalmente en su genoma. Por esto el método involucra hacer una genoteca de expresión del genoma del patógeno en vectores adecuados que permiten la expresión de los potenciales genes antigénicos o de parte de ellos que hayan logrado clonar. Este genoma puede ser luego reducido en sucesivas etapas de fraccionamiento hasta llegar a plasmidios protectivos individuales. Por ello, este enfoque permite también descubrir genes candidatos individuales y utilizarlos como vacunas recombinantes. El asunto crítico en la aplicación de una inmunización con genotecas de expresión, es su sensibilidad. Por ejemplo, para cubrir el genoma de un patógeno bacteriano de  $3 \times 10^6$  pb en fragmentos de 500 pb requeriría aproximadamente de 6.000 clones. Pero, solamente 1/6 de éstos estaría en el marco y dirección correcta. De modo que un equivalente de expresión requeriría de 36.000 clones. Por último, es importante destacar que en peces (Kanellos y cols., 1999) y, específicamente en carpas (*Cyprinus carpio*), en truchas (*Oncorhynchus mykiss*) y en pez dorado (*Carassius auratus* L.), ha sido descrita la metodología para expresar genes exógenos inyectados intramuscularmente (Hansen y cols., 1991; Anderson y cols., 1996a y Russell y cols., 1998, respectivamente.). En el segundo caso además, el grupo de Anderson ha



demostrado que las truchas inyectadas en la musculatura esquelética, con un plasmidio que contiene los genes que codifican para proteínas del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y que están bajo el control de un promotor de citomegalovirus, producen anticuerpos neutralizantes los cuales confieren protección a las truchas cuando son desafiadas con IHNV (Anderson y cols., 1996b).

Herrmann, et al. (United States Patent 6,165,993) describen una aplicación concreta de las vacunas de ADN para generar respuesta inmune contra rotavirus en diferentes vertebrados.

Para el caso particular de la aplicación de las vacunas de ADN contra enfermedades rickettsiales, Barbet et al. (United States Patent 6,025,338) dieron a conocer una composición que comprende un polinucleótido aislado, que es capaz de inducir respuesta inmune contra una enfermedad causada por una rickettsia patógena, entre las que se encuentran *Cowdria ruminantium*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Anaplasma marginale*.

La patente de invención de Davis (United States Patent 6,180,614) describe la utilización general de las vacunas de ADN como método de inmunización de especies de acuicultura. Esta patente también da a conocer los métodos de administración de los sistemas de expresión de ADN a los peces. Tales métodos incluyen la técnicas de inyección, pulverización e inmersión.

#### Transglicosidasas líticas soluble y de membrana

Las transglicosidasas son enzimas que actúan hidrolizando el peptidoglicán que forma parte de la pared de las bacterias. El peptidoglicán forma el llamado sacculus bacteriano y tiene la función de proteger a la célula del estrés mecánico y mantener la presión osmótica interna de la bacteria. Está compuesto por cadenas lineales de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina entrecruzados por pequeños péptidos que dan rigidez a la pared. Sin embargo la célula requiere a su vez de flexibilidad para poder crecer y dividirse. Esta flexibilidad está dada por un equilibrio entre las actividades de síntesis e hidrólisis que actúan sobre el peptidoglicán (Höltje & Schwarz, 1985). Hasta la fecha se han descrito alrededor de 10 diferentes actividades sintetizadoras y alrededor del mismo número de actividades de hidrólisis que difieren en los diferentes puntos donde cortan la macromolécula. En este equilibrio de actividades son las enzimas que degradan el peptidoglicán las que poseen un rol fundamental, no solo para la ruptura de la pared durante la división celular sino también creando espacio y nuevos sitios.

aceptores de material para remodelar y hacer crecer la pared durante el crecimiento celular y permitir además el transporte de DNA, toxinas, flagelo y otras proteínas por la tupida red de peptidoglicán (Höltje, 1995; Höltje & Tuomanen, 1991; Goodell, 1985; Dijkstra & Keck 1996). Dentro de estas enzimas son de especial interés las transglicosilasas líticas, identificadas originalmente en *E. coli*. Estas enzimas hidrolizan la unión glicosídica  $\beta$ -1,4 entre los residuos de el ácido N-acetilmurámico y los residuos de N-acetilglucosamina, degradando completamente el peptidoglicán *in vitro* como lo hacen las lisozimas (Höltje y col., 1975). Pero a diferencia de estas últimas, las transglicosilasas concomitante con el corte, catalizan la unión entre los carbonos 1 y 6 de los residuos de ácido N -acetilmurámico, liberando como producto a partir de esta red insoluble, hebras solubles de 1,6 anhidromuropéptidos que han provocado gran interés por su capacidad de estimular el sistema inmune en mamífero (Dokter y col 1994) y otras propiedades relacionadas con patogénesis en algunas especies (Melly y col 1984; Cookson y col. 1989). La actividad no controlada de las transglicosilasas endógenas causan la autólisis celular y por esto se han denominado transglicosilasas líticas (Betzner y col., 1990).

Se han aislado 6 diferentes transglicosilasas de *E. coli*. Una de ellas es soluble y se localiza en el espacio periplásmico y tiene un PM de 70 kDa (SLT70) (Engel y col 1991). Las otras 5 son lipoproteínas que están unidas a la membrana externa de las bacterias Gram(-), a través de la cara interna de esta y localizadas por esto en la región más externa del espacio periplásmico. Estas se han denominado MLTA (Ursinus & Höltje, 1994; Lommatzsch y col, 1997); MLTB (Ehlert y col ,1995; Engel y col. 1992); MLTC (Dijkstra & Keck 1996); MLTD y EmtA (Kraft y col 1998). Las distintas enzimas no solo difieren en su preferencia de sustrato, actividad enzimática y susceptibilidad frente a inhibidores glicopeptídicos (Romeis y col. 1993), sino también en su secuencia proteica, conservándose algunos dominios de consenso entre las diferentes MLT (Koonin & Rudd, 1994 ; Lommatzsch y col.,1997). Genes homólogos a estas enzimas se han descrito en *Pseudomonas aeruginosa* (Blackburn y Clark, 2002), *Bordetella pertussis* (Cookson y col ,1989) y *Neisseria gonorrhoeae* (Sinha & Rosenthal, 1980) entre otros y se espera que este presente en un amplio rango de bacterias Gram negativas. La transglicosidasa que ha sido estudiada en mayor detalle es la SLT70 que codifica para una enzima monomérica de 618 aa y es inhibida por el antibiótico Bulgecina A en tratamiento combinado con el compuesto  $\beta$ -lactámico furazlocillina (Templin y col 1992). Estudios cristalográficos han demostrado una estructura de rosquilla, a través de la cual la enzima se uniría fuertemente al peptidoglicán (van Asselt y col. 1999 b; Dijkstra & Thunninssen 1994; Höltje, 1996). Alguna de las transglicosidasas de membrana no son



inhibidas por bulgecina A, lo que ha permitido diferenciar su actividad en experimentos *in vivo* e *in vitro*. Se ha descrito una enzima soluble de 35 kDa (SLT35) completamente activa que es el resultado proteolítico de la hidrólisis de los primeros 40 aminoácidos de la enzima de membrana de 40 kDa MLT B (Engel y col., 1992; Dijkstra y col., 1995; Ehler y col., 1995). Al igual que la transglicosidasa soluble de 70 kDa (SLT70) se cristalizó la fracción soluble SLT35 unida a fragmentos de peptidoglicán, lo que permitió dilucidar los diferentes dominios y los aminoácidos involucrados en la unión al peptidoglicán (van Asselt & Dijkstra 1999a; van Asselt y col., 2000). SLT35 posee 3 dominios;  $\alpha$ ,  $\beta$  y el centro activo ubicado entre estos dos que presenta un plegamiento semejante al de la lisozima y al sitio activo de la SLT70. A pesar de la diferencia en su secuencia aminoacídica entre las 2 SLT, existe una coincidencia en algunos aminoácidos del sitio activo en su interacción con los sustratos. Una característica singular de SLT35 es la presencia en su centro activo, de un plegamiento tipo mano de EF de unión a  $\text{Ca}^{++}$  que le da termoestabilidad a la molécula y que solo ha sido descrito anteriormente en procariontes para la enzima periplasmática de unión a glucosa/galactosa (GBP) (Vyas y col., 1987). Tanto la SLT35 como SLT70 son exomuridasas que requieren de las cadenas peptídicas del peptidoglicano para su actividad (Beachey y col. 1981; Romeis y col., 1993) siendo el dominio N-terminal en forma de rosquilla de la SLT y los residuos 99-108 de SLT35 los responsables de esta actividad (van Asselt y col., 1999a, 1999b). A diferencia de estas últimas transglicosilasas, la enzima MLTA es activa sobre hebras de glicán libres de péptido (Romeis y col., 1993).

Estudios de NMR han permitido estudiar los diferentes motivos presentes en la transglicosilasa de membrana MLTD y se ha descrito en el extremo carboxilo de esta transglicosilasa, la presencia de dos motivos LysM que tienen como función general, la unión a peptidoglicán y se encuentra ampliamente distribuido en diferentes moléculas que se asocian al peptidoglicán, especialmente en enzimas que degradan esta macromolécula (Bateman & Bycroft, 2000). Si bien la función exacta de MLTD se desconoce, datos recientes basados en la distribución filogenética de la proteína sugieren que podría estar involucrada en la biosíntesis flagelar (Pellegrini y col 1999).

Las funciones de cada una de estas diferentes transglicosidasas en la células es aun desconocidas pero la presencia de estas diversas moléculas que comparten la misma actividad da luces del complejo mecanismo de coordinación entre síntesis y degradación que debe existir para garantizar el correcto crecimiento del sacculus durante la división celular para mantener la forma específica de la bacteria. El estudio



de interacción proteína-proteína mediante cromatografía de afinidad desarrollado por el grupo de Vollmer (Vollmer y col., 1999; von Rechenberg y col., 1996) ha demostrado la interacción de la transglicosidasa MLTA con varias enzimas encargadas de la síntesis de peptidoglicán reconstituyendo *in vitro* un complejo multienzimático que permitiría postular la existencia de una holoenzima hipotética responsable del crecimiento controlado de la pared celular bacteriana.

Las transglicosidasas son un blanco interesante para estudiar el metabolismo del peptidoglicán, más aun si consideramos que la actividad de estas enzimas esta dirigida a las uniones glicosídicas entre las hebras de glicanes lo que abre la posibilidad de diseñar nuevos antibióticos diferentes a la penicilina y los compuestos  $\beta$ -lactámicos relacionados, cuyo blanco han sido las enzimas sintetizadoras e hidrolisadoras de las uniones de tipo peptídicas que entrelazan las hebras de glicanes (Waxman y Strominger.,1983). No obstante, más atractivas en lo que se refiere a aplicaciones biotecnológicas resultan las transglicosilasas por la alta respuesta inmune de tipo celular contra MLTA observada por el grupo de Pizza (Pizza y col., 2000) al seleccionar antígenos de superficie para desarrollar una vacuna contra *Neisseria meningitidis*. Esta alta inmunogenicidad celular resulta fundamental en el momento de seleccionar candidatos para desarrollar una vacuna contra un patógeno intracelular como es el caso de *Piscirickettsia salmonis* y en especial para una vacuna de ADN. El gen aislado de *P. salmonis* para la transglicosilasa de membrana corresponde al tipo MLTB.

#### Definición del Problema Resuelto por la Invención

Actualmente hay una necesidad creciente de vacunas para las infecciones masivas de especies de acuicultura. Tal como se explicó anteriormente, las vacunas existentes en el mercado basadas en bacterinas son de uso restringido y con escasa documentación acerca de su efectividad. Además, la producción de bacterinas para SRS es de alto costo, debido a la complejidad del sistema de cultivo. La presente invención soluciona los problemas del presente estado de la técnica, empleando los conocimientos modernos de biología molecular, para producir vacunas de ADN y vacunas recombinantes contra el SRS. Ello permite la producción de estas vacunas en gran escala y con alta efectividad, haciendose independiente de los complejos sistemas de cultivo requeridos para la proliferación de *Piscirickettsia salmonis*.





### Definición de la invención

En general, la invención se refiere a una vacuna de ADN para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, especialmente en especies de acuicultura, tales como el salmón Coho, el salmón del Atlántico, el salmón Chinook o la trucha, basada en un fragmento de ADN que codifica para las proteínas transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis*, y su procedimiento de preparación. La invención también describe un oligonucleótido purificado útil para la producción de una vacuna contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados y una vacuna recombinante preparada a partir de este oligonucleótido.

El término "vacuna" se refiere aquí a cualquier material capaz de producir una respuesta inmune en el animal que ha recibido este material.

La vacunación con ácidos nucleicos se refiere al procedimiento mediante el cual se induce una respuesta inmune a una proteína expresada "in vivo" luego de la introducción de una secuencia oligonucleotídica que codifica para esta proteína. Por lo tanto, el concepto de "vacuna de ADN", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier segmento de ADN que al ser introducido a un animal, produce la respuesta inmune explicada en la frase anterior.

El principal objeto de la presente invención es una vacuna de ADN, que comprende un fragmento de ADN que codifica para las proteínas transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta, insertado en un plásmido vector adecuado para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

En una realización preferida de esta invención, dicho fragmento de ADN corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 (ver Figura 1) o un fragmento de ésta. Alternativamente, dicho fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 1, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado. Para ambas realizaciones, se ha llegado a establecer que la proteína transglicosidasa lítica soluble de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácídica Sec Id N° 2 (ver Figura 2) o una región inmunogénica de ésta.



En otra realización preferida de esta invención, dicho fragmento de ADN corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 3 (ver Figura 3) o un fragmento de ésta. Alternativamente, dicho fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 3, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado. Para ambas realizaciones, se ha llegado a establecer que la proteína transglicosidasa lítica de membrana de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácídica Sec Id N° 4 (ver Figura 4) o una región inmunogénica de ésta.

En otra realización preferida de la vacuna de ADN de acuerdo a la invención, el plasmidio vector adecuado presenta las siguientes características a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del ARN mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección. Preferentemente, dicho plasmidio vector es el plasmidio pUK21-A2.

En particular, dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura, preferentemente es el salmón Coho, el salmón del Atlántico, el salmón Chinook o la trucha

En otra realización preferida de la vacuna de ADN de acuerdo a la invención, ella se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, la pulverización y la inmersión. Además, la vacuna comprende un adjuvante adecuado y/o un transportador farmacéuticamente aceptable.

En otra versión prevista de la presente invención, la presencia de anticuerpos contra las proteínas transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana generadas por la vacuna de ADN se detecta por un método, según el cual después de un tiempo se extrae sangre del vertebrado vacunado y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra las proteínas transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana.

Un segundo objeto principal de la invención es un procedimiento para la preparación de la vacuna de ADN contra *Piscirickettsia salmonis*, que comprende las siguientes etapas:



a) Clonar los fragmentos de ADN que codifican para las proteínas transglicosidasa lítica soluble (SLT70) y transglicosidasa lítica de membrana (MLT) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de éstas.

b) Insertarlo en un plásmido vector adecuado para su expresión y generación de una respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

En una realización preferida, el procedimiento comprende un fragmento de ADN corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 o un fragmento de ésta. Alternativamente, el fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 1, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado. Para ambas realizaciones, se ha llegado a establecer que la proteína transglicosidasa lítica soluble de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácídica Sec Id N° 2 (ver Figura 2) o una región inmunogénica de ésta.

En otra realización preferida, el procedimiento comprende un fragmento de ADN corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 3 o un fragmento de ésta. Alternativamente, el fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 3, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado. Para ambas realizaciones, se ha llegado a establecer que la proteína transglicosidasa lítica de membrana de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácídica Sec Id N° 4 (ver Figura 4) o una región inmunogénica de ésta.

En otra realización preferida, el procedimiento comprende el plasmidio vector adecuado presenta las siguientes características a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del ARN mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección. Preferentemente, dicho plasmidio vector es el plasmidio pUK21-A2.

En particular, el vertebrado corresponde a una especie de acuicultura, preferentemente es el salmón Coho, el salmón del Atlántico, el salmón Chinook o la trucha.



En otra realización preferida del procedimiento según la invención, la vacuna se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, la pulverización y la inmersión.

Un tercer objeto principal de la invención es uno o más segmentos de ADN purificados, útiles para la producción de una vacuna contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, los cuales codifican para las proteínas transglicosidasa lítica soluble y/o transglicosidasa lítica de membrana de *Piscirickettsia salmonis* o regiones inmunogénicas de éstas. En una realización preferida de esta invención, el segmento de ADN tiene la secuencia nucleotídica Sec Id Nº 1 y/o Sec Id Nº 3 (ver Figuras 1 y 3) o fragmentos de éstas. Alternativamente, el segmento de ADN tiene una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id Nº 1 y/o Sec Id Nº 3, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado. Para ambas realizaciones, se ha llegado a establecer que las proteínas transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana de *Piscirickettsia salmonis* corresponden a las secuencias aminoácidicas Sec Id Nº 2 y Sec Id Nº 4 (ver Figuras 2 y 4) o regiones inmunogénicas de éstas.

En particular, el vertebrado corresponde a una especie de acuicultura, preferentemente es el salmón Coho, el salmón del Atlántico, el salmón Chinook o la trucha.

En otra realización de la presente invención, el oligonucleótido se emplea para producir una vacuna recombinante para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, donde las proteínas transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de esta se produce empleando un vector de expresión y un hospedero adecuados. En particular, el vertebrado corresponde a una especie de acuicultura, preferentemente es el salmón Coho, el salmón del Atlántico, el salmón Chinook o la trucha. En otra versión prevista, el vector de expresión es un plasmidio, preferentemente el vector pET32a. Por otra parte, se ha determinado que el hospedero es una bacteria, preferentemente *E. coli*.

En otra realización preferida de la vacuna recombinante de acuerdo a la invención, ella se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular e intraperitoneal, la pulverización y la inmersión. Además, la



vacuna comprende un adjuvante adecuado y/o un transportador farmacéuticamente aceptable.

En otra versión prevista de la presente invención, la presencia de anticuerpos contra las proteínas transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis* generados por la vacuna recombinante se detecta por un método, según el cual después de un tiempo se extrae sangre del vertebrado vacunado y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra las proteínas transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis* mediante ELISA.

### **Descripción de las Figuras**

#### **FIGURA 1:**

Esta Figura muestra la secuencia nucleotídica (Sec Id N° 1) del gen que codifica para la proteína transglicosidasa lítica soluble (SLT70) de *Piscirickettsia salmonis*.

#### **FIGURA 2:**

Esta Figura muestra la secuencia aminoacídica (Sec Id N° 2) de la proteína transglicosidasa lítica soluble (SLT70) de *Piscirickettsia salmonis*.

#### **FIGURA 3:**

Esta Figura muestra la secuencia nucleotídica (Sec Id N° 3) del gen que codifica para la proteína transglicosidasa lítica de membrana (MLT) de *P. salmonis*.

#### **FIGURA 4:**

Esta Figura muestra la secuencia de aminoácidos (Sec Id N° 4) de la proteína transglicosidasa de membrana (MLT) de *Piscirickettsia salmonis*.

#### **FIGURA 5:**

En esta Figura se muestra la representación esquemática del plásmido pUK21-A2.

#### **FIGURA 6:**

En esta Figura se muestra la representación esquemática del plásmido pUK21-A2, conteniendo el inserto con el gen de transglicosidasa lítica soluble de *P. salmonis*, denominado pUK21-A2 SLT70.



FIGURA 7:

En esta Figura se muestra la representación esquemática del plasmidio pUK21-A2 conteniendo el inserto con el gen de la transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis* denominado pUK21-A2 MLT.

FIGURA 8:

En esta Figura se muestra la estructura del plasmidio pET-32a

FIGURA 9:

En esta Figura se muestra la estructura del plasmidio pET32a-SLT70S1.

FIGURA 10:

En esta Figura se muestra la estructura del plasmidio pET32a SLT70S2.

FIGURA 11:

Esta Figura muestra la estructura del plasmidio pET32a MLTS1.

FIGURA 12:

Esta Figura muestra la estructura del plasmidio pET32a MLTS2.

FIGURA 13:

En esta Figura se muestra la producción de transglicosidasa lítica soluble, segmento S1 (SLT70S1) y transglicosidasa lítica soluble, segmento S2 (SLT70S2) de *P. salmonis* en *E. coli*.

FIGURA 14:

En esta Figura se muestra la producción de transglicosidasa lítica de membrana, segmento S1 (MLTS1) y transglicosidasa lítica de membrana, segmento S2 (MLTS2) de *P. salmonis* en *E. coli*.

**EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos ilustran algunas aplicaciones concretas de la invención, pero no pretenden limitar el marco ni los alcances de la presente invención.



**Ejemplo 1: Aislamiento, clonación y secuencia del gen de la transglicosidasa lítica soluble de *P. salmonis***

a) Cultivo de Células CHSE-214.

Inóculos de células CHSE-214 (ATCC 1681), mantenidos en N<sub>2</sub> líquido se descongelaron y se cultivaron en frascos T 175 en medio MEM a 16°C por 7 días o hasta que las células lleguen a confluencia.

b) Cultivo de *P. salmonis*.

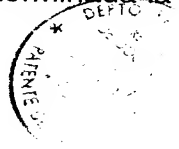
Se usaron inóculos de *P. salmonis* que contienen al menos un título de  $1 \times 10^8$  bacterias/mL a cada uno de los frascos T175 con células CHSE-214. Al día siguiente, se retiró el medio y se agregó 50 mL de medio MEM-completo fresco. El cultivo se realizó a 16°C por 10 a 14 días, observando periódicamente al microscopio de contraste de fases, el grado de lisis de las células CHSE-214 provocada por la infección bacteriana. Cuando el efecto citopático fue de alrededor del 100% de las células, el cultivo de *P. salmonis* se consideró listo para ser cosechado o para una posterior propagación del cultivo. Las bacterias se cosecharon utilizando un raspador de células. Una vez colectado, el lisado se centrifugó y el sobrenadante colectado corresponde a la fracción semipurificada de *P. salmonis*.

c) Purificación de *P. salmonis*.

Para purificar la bacteria, la suspensión con la fracción semipurificada de *P. salmonis* se sometió a una centrifugación en gradiente de densidad obteniéndose una banda mayoritaria cerca del fondo del tubo de centrifuga. Esta banda se colectó y se lavó dos a tres veces mediante centrifugación con una solución tampón. El sedimento o pellet final constituye la fracción purificada de *P. salmonis*.

d) Preparación de ADN genómico de *P. salmonis*

Nuestro procedimiento se basa en el protocolo de Binder, (Binder, 1995). En breve, la fracción purificada de *P. salmonis* se lavó con tampón PBS y se le agregó 20 µL de una solución de 10 mg/mL de DNasa I y se incubó a 37°C durante 30 min. Luego de la centrifugación para eliminar el sobrenadante, <sup>el pellet</sup> la pella se resuspendió en 500 µL de PBS mas 100 µL de EDTA 0,1 M para detener la actividad de la DNasa I. Se agitó suavemente por inversión, se volvió a centrifugar y <sup>el pellet</sup> la ~~pella~~ ~~exenta~~ de DNasa I, se resuspendió en 1 mL de tampón de lisis (sacarosa 0,75 M, NaCl 400 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 50 mM, SDS 0,2 %, 1 mg de Proteinasa K, pH 9). Se agitó suavemente por inversión y se incubó a 58°C durante 1 hora con agitación suave. Una vez terminada la



incubación con la proteasa, la solución se extrajo con un volumen de fenol saturado con Tris-HCl (pH 8) y luego se extrajo 2 veces con una mezcla de cloroformo alcohol isoamílico 24:1. Posteriormente, el ADN se precipitó con 0,4 volúmenes de acetato de amonio 5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 min.

e) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En tubos Eppendorf de 500  $\mu\text{L}$  autoclavados, se les agregó 5  $\mu\text{L}$  de tampón PCR 10 X sin Mg, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 4  $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTP 2,5 mM, 2,5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los oligonucleótidos partidores (10  $\mu\text{M}$  de cada uno), 100 ng de ADN templado, 0,5  $\mu\text{L}$  de Taq ADN polimerasa 5 U/ $\mu\text{L}$  y se completó a un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con agua miliQ estéril. Se emplearon las condiciones experimentales indicadas por Mauel (Mauel y col., 1996).

f) Electroforesis en geles de agarosa.

Para determinar la integridad del ADN genómico de *P. salmonis*, así como la del ADN plasmidial, y la de los productos de amplificación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1 y 2%. Este procedimiento se efectuó de acuerdo a Sambrook (Sambrook y col., 1989).

g) Clonamiento y secuenciación del gen de la proteína transglicosidasa lítica soluble (SLT70) de *P. salmonis*.

Mediante el uso de algoritmos para la comparación de homología de secuencia de ADN (PCGene y National Center for Biotechnology Information) se determinó la localización de las secuencias más conservadas en el gen de la transglicosidasa lítica soluble de gama proteobacterias y de otras bacterias cuyos genes de estas proteínas muestran homologías con *P. salmonis*. Paralelamente, se realizaron análisis de hidrofiliidad de estas especies para determinar las regiones de la proteína donde existen determinantes antigénicos fuertes. Con esta información se definió las regiones del gen de la transglicosidasa lítica soluble de *P. salmonis* a ser amplificadas mediante PCR.

El gen de la SLT70 se aísla a partir de DNA de *P. salmonis* usando los partidores a) sentido: 5'-CAGGAATTGACATAATGCCATACTACACTT-3' y b) antisentido: 5'-CAGCTCGAGTTAAACACGCCTAATTCCAGCATT-3', los cuales se utilizaron en una reacción polimerásica en cadena, usando DNA cromosomal de *P. salmonis* altamente purificado como templado. Este proceso dio origen a un fragmento de aproximadamente 1.775 pares de bases que fue clonado en el vector pGEMt. Una vez aislado ADN del plasmidio resultante (pGEMt SLT70) el inserto se secuenció, demostrándose la





presencia de un gen que codifica para una proteína SLT que carece 58 aminoácidos de su extremo carboxilo terminal y de alta homología con la transglicosidasa lítica soluble de otros organismos.

El gen de la MLT se aísla a partir de DNA genómico de *P. salmonis* usando los partidores a) sentido: 5'-GACGAATTCATGAGACGATCTTATTGGCTA-3' y b) antisentido: 5'-GACCTCGAGTATTTTAAGAGCCTTTTGAGTG-3'. Este proceso da origen a un fragmento de aproximadamente 1.062 pares de bases que fue clonado en el vector pGEMt obteniéndose pGEMt MLT, el cual fue confirmado por secuenciación.

Los resultados se presentan en las Figuras 1, 2, 3 y 4. En la Figura 1 se muestra la secuencia nucleotídica (Sec Id N° 1) del gen que codifica para la proteína transglicosidasa lítica soluble de *Piscirickettsia salmonis* (SLT70). En la Figura 2 se muestra la secuencia aminoacídica (Sec Id N° 2) de la proteína transglicosidasa lítica soluble de *Piscirickettsia salmonis*. En la Figura 3 se muestra la secuencia nucleotídica (Sec Id N° 3) del gen que codifica la proteína transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis* (MLT). En la Figura 4 se muestra la secuencia aminoacídica (Sec Id N° 4) de la transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis*.

**Ejemplo 2:** Preparación de un vector para vacuna genética. Clonación de los genes de transglicosidasa lítica soluble y la transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis* en el plasmidio pUK21-A2.

El vector pUK21-A2 posee las siguientes características necesarias para ser utilizado como vacuna de ADN: a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del ARN mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección.

a) Preparación de ADN del plasmidio pUK21-A2.

ADN plasmidial obtenido de *E. coli* HB 101 se purificó mediante el uso del kit comercial Qiagen Plasmid Purification (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones indicadas por el proveedor. El plasmidio se digirió con las enzimas Eco RI y BamHI. A continuación se procedió a desfosforilar los extremos del vector digerido agregando 2 µL de fosfatasa alcalina (1 U/µL) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalmente el ADN plasmidial preparado se purificó mediante el sistema "Wizard" (Promega, Madison Wisconsin, USA). La Figura 5 muestra la representación esquemática del plásmido pUK21-A2.



b) Clonación de los genes de transglicosidasa lítica soluble y la transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis* en el vector pUK21-A2.

Para la preparación de un vector conteniendo el gen de SLT70 para vacuna genética se diseñan 2 nuevos partidores que incluyen las secuencias del comienzo y del final del gen de SLT70 de *P. salmonis* y también las secuencias de sitios específicos para endonucleasas de restricción BamHI y EcoRI.

Estos partidores son a) sentido: 5'-CAGGGATCCGACATAATGCCATACTACACTT-3' y b) antisentido: 5'-CAGCTGCAGTTAAACACGCCTAATTCCAGCATT-3'. Idénticamente para la preparación de un vector conteniendo el gen de MLT se usaron los siguientes partidores a) sentido: 5'-GACGGATCCATGTAGACGATCTTATTGGCTA-3' y antisentido: 5'-GACGAATTCTATTTTAAGAGCCTTTTGAGTG-3'. Mediante estos partidores se efectúa una reacción de polimerasa en cadena usando DNA cromosomal altamente purificado de *P. salmonis* (igual al descrito en el Ejemplo 1) como templado. Como resultado se obtienen fragmentos que se aíslan, luego de digestión con las endonucleasas BamHI y EcoRI se ligan al plásmido pUK21-A2 generándose los vectores vacuna pUK21-A2-SLT70 y pUK21-A2 MLT. En la Figura 6 se muestra la representación esquemática del plásmido, conteniendo el inserto del gen de la transglicosidasa lítica soluble de *P. salmonis* y en la Figura 7 se muestra lo mismo para el gen de la transglicosidasa de membrana de *P. salmonis*.

**Ejemplo 3: Desarrollo de anticuerpos en ratones luego de inyección intramuscular del plásmidos pUK21-A2-SLT70 y pUK21-A2-MLT.**

Los plásmidos que contienen el gen de la SLT70 y de MLT en un vector de expresión animal, denominados pUK21A2-SLT70 y pUK21A2-MLT, luego de inyectados en el músculo de ratón son capaces de expresar esta proteína y desarrollar una respuesta inmune que da origen a la aparición de anticuerpos. Esto se demuestra de la siguiente manera. Se prepara una solución de cada uno de los plásmidos en el tampón PBS a una concentración de ADN de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Ratones, pertenecientes a la cepa Balb/c son inyectados en el músculo del femur de las extremidades posteriores con 2 dosis de 100  $\mu\text{l}$  de una solución de 50  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  de ADN plasmidial (se inyectan 50  $\mu\text{l}$  en cada extremidad). Esta inyección se realiza el día cero y una segunda dosis se administra a los 15 días (día 15). Como control se realiza la misma operación usando ADN plasmidial control que no posee los genes de SLT ni MLT (pUK21-A2).



Luego de transcurridos 45 días (día 45) se extrae sangre de los ratones y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra la transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana mediante ELISA.

a) Determinación de anticuerpos anti la transglicosidasa lítica soluble y transglicosidasa lítica de membrana mediante ELISA.

Los ratones inmunizados a los días 0 y 15 con los plasmidios pUK21A2 y pUK21A2-SLT70 y pUK21A2-MLT son sangrados al día 45, con un corte en la vena caudal inferior de la cola. Los 250  $\mu$ l de sangre obtenidos, son incubados a 37°C por una hora a fin de obtener el suero. También se realiza el mismo procedimiento de sangrado y obtención del suero antes de la inmunización. Esta muestra es llamada suero pre-inmune.

La evaluación de la respuesta inmune humoral de los ratones inmunizados con los plasmidios se determina por ELISA, tal como se describe a continuación.

- 1.- Placas de poliestireno de 96 pocillos, previamente tratadas con una proteína fenólica bioadhesiva (pegotina), son activadas con 10  $\mu$ g/ml de antígeno, 50  $\mu$ l/pocillo. Se incuban durante 90 min a temperatura ambiente.
- 2.- Se elimina el antígeno y se bloquean los sitios inespecíficos con una solución de caseína sacarosa al 4%, 300  $\mu$ l/pocillo durante 60 min a temperatura ambiente.
- 3.- Se adiciona en cada pocillo 50  $\mu$ l de una dilución seriada del suero de los ratones inmunizados y suero pre-inmune. Se incuba durante 90 min a temperatura ambiente.
- 4.- Se eliminan las muestras de suero y se lava la placa con 300  $\mu$ l/pocillo de tampón fosfato salino, conteniendo Tween 20 al 0,02%. Esto se realiza 3 veces, con intervalos de 5 min entre cada ciclo de lavado.
- 5.- Se elimina la solución del último lavado y se agregan 50  $\mu$ l/pocillo de un anticuerpo de cabra anti inmunoglobulina G de ratón, unido a fosfatasa alcalina, en la dilución recomendada por el fabricante en solución de bloqueo. Se incuba por 30 min. a temperatura ambiente y luego se procede como en el punto 4.
- 6.- Se elimina la solución del último lavado y se agregan 50  $\mu$ l/pocillo de una solución que contiene 1 mg/ml de paranitrofenil fosfato en tampón Tris 100 mM, cloruro de sodio 100mM y cloruro de magnesio 5mM (pH 9.5). Se incuba 30 minutos a 37°C.
- 7.- La reacción será detenida con hidróxido de sodio 3M y se lee en espectrofotómetro a 405 nm de longitud de onda.

Como se indica en los resultados de la Tabla 1, el suero de los ratones inyectados con el plasmidio pUK21A2-SLT70 reacciona con la proteína transglicosidasa lítica soluble



en ELISA indicando que contiene anticuerpos específicos contra esta proteína. Igual resultado se obtiene con pUK21A-MLT. En contraste, aquellos ratones inyectados con una preparación control (pUK21A2), no desarrollan anticuerpos contra la transglicosidasa lítica soluble. Este ejemplo demuestra que mediante la inyección de genes de transglicosidasa lítica soluble, preparados de acuerdo a lo descrito en esta invención se logra estimular el sistema inmune del ratón y desarrollar una respuesta humoral en la forma de anticuerpos anti transglicosidasa lítica soluble.

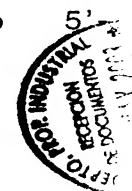
Tabla I. Medición de anticuerpos anti transglicosidasas lítica soluble y de membrana de *P. salmonis* en ratones inmunizados con pUK21A2-SLT70 y pUK21A2-MLT.

Muestra	Lectura O.D. 405 nm/30 min	
Suero preinmune	0.04	
Suero ratón inmunizado con pUK21A2 (control)	0.05 *	
Suero de ratón inmunizado con pUK21A2-SLT70	0.32 *	
Suero de ratón inmunizado con pUK21A2-MLT	0.25 *	

\* Promedio de 4 ratones diferentes.

**Ejemplo 4:** Producción de la proteínas recombinantes de la transglicosidasa lítica soluble SLT70 de *P. salmonis* mediante clonamiento de los segmentos S1 y S2 del gen SLT70 en el vector de expresión bacteriana pET32a y su posterior purificación.

Luego de confirmar la secuencia del gen que codifica la transglicosilasa lítica soluble SLT70 de *P. salmonis*, se amplifica por separado un segmento S1 que codifica para 182 aminoácidos dentro de la región aminoterminal y el segmento carboxilo terminal S2 de aproximadamente 308 aminoácidos. Esto porque la expresión de SLT70 completa aparentemente es tóxica para la célula, por su actividad catalítica sobre el peptidoglicán. El segmento S1 de 547 pb se aísla mediante PCR a partir de ADN genómico mediante partidores sentido y antisentido que contienen en sus extremos los sitios de restricción EcoRI y XhoI respectivamente. Estos oligos son sentido: 5'-CTCGAATTCAAGCAACTTACCAACTCTCTG-3' y antisentido 5'-GACCTCGAGTTACCAAGTTGTTCTAGCGCACG-3'. Para el segmento S2 de 925pb se procede de igual manera usando los partidores sentido

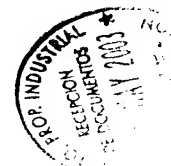


CTCGAATTCGCTATCACCAAGAGCATTGCT-3' y antisentido 5'-CAGCTCGAGTTAAACACGCCTAATTCCAGCATT-3'. Ambos productos de PCR se clonan en el vector pGEMT y se identifican los clones positivos por PCR y digestión enzimática, obteniéndose los plasmidios pGEMT-SLT70S1 y pGEMT-SLT70S2. Se aísla el gen de SLT70 desde ambos clones mediante las enzimas EcoRI y XhoI y se purifican por electroforesis en gel de <sup>agarosa</sup> agarosa. Los genes purificados se ligan usando ligasa de fago T4 al vector pET32a (Figura 8) cortado con EcoRI y XhoI. Los clones positivos se identifican mediante digestión con estas enzimas. En las Figuras 9 y 10 se muestra la estructura de los plasmidios resultantes pET32a-SLT70S1 y pET32a-SLT70S2. Se obtuvo DNA plasmidial de cada uno de los clones recombinantes y se usaron para transformar células competentes de *E. coli*. La expresión de las proteínas SLT70S1 y SLT70S2 se induce en un cultivo de células recombinantes por acción de IPTG 1mM. Ambas proteínas recombinantes están presentes en la fracción bacteriana insoluble y se purifican parcialmente por lavados sucesivos con concentraciones crecientes de urea y posterior solubilización en SDS 0.3%.

En la figura 13 se presenta un gel de poliacrilamida con SDS hecho de acuerdo a Laemmli (Laemmli, 1970) que muestra la producción de las proteínas transglucosilasa líticas solubles SLT70S1 y SLT70S2 de *P. salmonis* por bacterias recombinantes transformadas con los plasmidios pET32a-SLT70S1 y pET32a-SLT70S2.

**Ejemplo 5:** Producción de la proteínas recombinantes de la transglucosidasa lítica de membrana MLT de *P. salmonis* mediante clonamiento de los segmentos S1 y S2 del gen MLT en el vector de expresión bacteriana pET32a y su posterior purificación.

Luego de confirmar la secuencia del gen que codifica la transglucosilasa lítica de membrana MLT de *P. salmonis*, se amplifica por separado el segmento aminoterminal S1 que codifica para 167 aminoácidos y el segmento carboxilo terminal S2 de aproximadamente 207 aminoácidos. Se realiza esta expresión de MLT en segmentos porque al igual que para SLT70, la sobreexpresión de la enzima catalítica completa no es viable para las bacterias. El segmento S1 de 500 pb se aísla mediante PCR a partir de ADN genómico mediante primers sentido y antisentido que contienen en sus extremos los sitios de restricción EcoRI y Xho I respectivamente. Estos oligos son sentido 5'-GACGAATTCATGAGACGATCTTATTGGCTA-3' y antisentido 5'-CAGCTCGAGTTATCACTGCGCCGCTTATAATC-3'. Para el segmento S2 de 621pb se procede de igual manera usando los primers sentido 5'-CTCGAATTCAATGTACTAACAACGTTAGCGT-3' y antisentido 5'-



GACCTCGAGTATTTTAAGAGCCTTTTGAGTG-3'. Ambos productos de PCR se clonan en el vector pGEMT y se identifican los clones positivos por PCR y digestión enzimática, obteniéndose los plasmidios pGEMT-MLTS1 y pGEMT-MLTS2. Se aísla el gen de MLT desde ambos clones mediante las enzimas EcoRI y XhoI y se purifican por electroforesis en gel de agarosa. Los genes purificados se ligan usando ligasa de fago T4 al vector pET32a (Figura 8) cortado con EcoRI y XhoI. Los clones positivos se identifican mediante digestión con estas enzimas. En las Figuras 11 y 12 se muestra la estructura de los plasmidios resultantes pET32a-MLTS1 y pET32a-MLTS2. Se obtuvo DNA plasmidial de cada uno de los clones recombinantes y se usaron para transformar células competentes de *E. coli*. La expresión de las proteínas MLTS1 y MLTS2 se induce en un cultivo de células recombinantes por acción de IPTG 1mM. Ambas proteínas recombinantes están presentes en la fracción bacteriana insoluble y se purifican parcialmente, por lavados sucesivos con concentraciones crecientes de urea y posterior solubilización en SDS 0.3%.

En la figura 14 se presenta un gel de poliacrilamida con SDS hecho de acuerdo a Laemmli (Laemmli, 1970) que muestra la producción de las proteínas transglucosilasa líticas de membrana MLTS1 y MLTS2 de *P. salmonis* por bacterias recombinantes transformadas con los plasmidios pET32a-MLTS1 y pET32a-MLTS2.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- AquaNoticias (1997). Nº 37 pág. 20; (1999). Nº 47, pág 6-15, Nº 48, 6-13.
- Anderson, E.D., Mourich, D.V., Leong, J.A.C. (1996a). Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Molec. Marine Biol. Biotech.* 5:105-113.
- Anderson, E.D., Scott, C.F., Acott, L., Shepherd, J., Leong, J.A.C. (1996b). Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molec. Marine Biol. Biotech.* 5: 114-122.
- Arriagada, R. (1996). Aplicación de la Citometría de Flujo en la Determinación de Sensibilidad *in vitro* de *P. salmonis* a Antibióticos. Tesis para optar al título de Bioquímico, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.
- Babiuk, L.A., Lewis, P.J., Cox, G., van Drunen, S., Baca-Estrada, M., Tikoo, S.K. (1995). DNA immunization with bovine herpes-1 genes. In *DNA Vaccines: A new era in vaccinology*. *Annals of the New York Acad. Sciences.* 772: 47.
- Barbet et al. Nucleic acid vaccines against rickettsial diseases and methods of use. United States Patent 6,025,338



- Barry, M.A., Wayne, C.L., Johnston, S.A. (1995). Protection against mycoplasma infection using expression library immunization. *Nature* 377: 6323.
- Barry, M.A., Johnston, S.A. (1997). Biological features of genetic immunization. *Vaccine*. 15(8): 788-791.
- Bateman, A. and Bycroft, M. (2000). The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosidase D (MLTD). *J. Mol. Biol.* 299: 1113-1119.
- Beachey, E.H., Keck, W., de-Pedro, M.A. and Schwarz, U. (1981). Exoenzymatic activity of transglycosylase isolated from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*; 116:355-358.
- Betzner, A.S., Ferreira, L.C., Holtje, J.V., Keck, W. (1990). Control of the activity of the soluble lytic transglycosylase by the stringent response in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 55: 161-164.
- Binder, S. (1995). Mitochondrial nucleic acid purification and analysis. *Methods in Mol. Biol.* 49: 383-389.
- Blackburn, N.T., Clarke, A.J. (2002). Characterization of soluble and membrane-bound family 3 lytic transglycosylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 41: 1001-1013.
- Bravo S., y Campos M. (1989) Síndrome del salmón Coho. *Chile Pesquero* 54: 47-48
- Bruno D., Poppe T., (1996). *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. Academic Press London.
- Bustos P., Midtving P., y Maira C. (1999) IPN, Un enorme desafío para la industria salmonera. *AquaNoticias* Nº 48, pág. 48-51.
- Cassigoli J. (1999). Foráneos sin Bienvenida. *Salmonoticias* Nº 72, pág. 18-19.
- Cookson, B.T., Cho, H.L., Herwaldt, L.A. and Goldman, W.E. (1989). Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 57:2223-2229.
- Davis, H.L., M-L. Michel, R.G. Whalen. (1993). DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum. Mol. Genet.* 2:1847.
- Davis H.L. DNA based vaccination of fish. **United States Patent 6,180,614**, January 30, 2001 (corresponde a Davis H.L Composición farmacéutica para la inmunización en peces que consiste en un vector de expresión con una secuencia de control de la expresión capaz de dirigir la expresión de a lo menos un polipéptido antigénico de patógenos virales, bacterianos y parasitarios, útil como vacuna de polinucleótidos para peces. la Solicitud de Patente Chilena 1935-1996)
- Dijkstra, B.W., Thunnissen, A.M. (1994) "Holy" proteins II: The soluble lytic transglycosylase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4(6):810-813.



- Dijkstra, A.J., Hermann, F. and Keck, W. (1995). Cloning and controlled overexpression of the gene encoding the 35kDa soluble lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. FEBS Lett. 366: 115-118.
- Dijkstra, A.J. and Keck, W. (1996). Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. J.Bacteriol. 178: 5555-5562.
- Dokter, W.H. Dijkstra, A.J., Koopmans, S.B., Stulp, B.K, Keck, W., Halie, M.R. and Vellenga, E. (1994). G (Anh)Mtetra, a natural bacterial cell wall breakdown product, induces interleukin-1 beta and interleukin-6 expression in human monocytes. A study of the molecular mechanisms involved in inflammatory cytokine expression. J. Biol. Chem. 269: 4201-4206.
- Donnelly J., Ulmer J., Liu M. (1995). Protective efficacy of intramuscular immunization with naked DNA. In DNA Vaccines: A new era in Vaccinology. Annals of the New York Acad. Sciences 772: 40-46.
- Donnelly J., Ulmer J., Shiver J., Liu M. (1997) DNA Vaccines. Ann. Rev. Immunol. 15: 617- 648.
- Ehlert, K. Hölte, J.-V. and Templin, M.F. (1995). Cloning and expression of a murein hydrolase lipoprotein from *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 16(4): 761-768.
- Elizalde J.J (1993). Estudio de la Respuesta Inmune Humoral de Salmonídeos, Contra el agente Causal del Síndrome del Salmón Coho. Memoria para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Engel, H., Kazemier, B. and Keck, W. (1991). Murein-metabolizing enzymes from *Escherichia coli*: sequence analysis and controlled overexpression of the SLT gene, which encodes the soluble lytic transglycosylase. J. Bacteriol. 173: 6773-6782.
- Engel, H., Smink, A.J., van Wijngaarden and Keck, W. (1992). Murein-metabolizing enzymes from *Escherichia coli*: existence of a second lytic transglycosylase. J. Bacteriol. 174: 6394-6403.
- Enriquez R. (1999) Conferencia: Agentes Microbianos en Peces. XXI Congreso Chileno de Microbiología, Dr Janis Grinbergs M.
- Felgner P., Tsai Y., Sukhu L., Wheeler C., Manthorpe M., Marshall J. Y Cheng S. (1995). Improved cationic lipid formulations for *in vivo* gene therapy. In DNA Vaccines: A new era in vaccinology. Annals of the New York Acad. Sciences. 772: 126-139.
- Fryer, J.L., Lannan, C.N., Garces L.H., Larenas J.J y Smith P. A. (1990) Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. Fish Pathol. 25 (2): 107-114.





- Fryer, J.L., Lannan, C.N., Giovannoni, S.J., Wood, N.D. (1992). *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:120-126.
- Fryer, J.L., Mauel M. J., (1997). The Rickettsia: an Emerging Group of Pathogens in Fish. *Emerging Infectious Diseases* 3 (2): 137-144.
- Gaggero, A. (1995) Procedimiento de obtención de una vacuna contra el síndrome rickettsial del salmon producido por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. Solicitud de Patente Chilena 01261-1995
- Goodell, E.W. (1985). Recycling of murein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 163:305-310.
- Hansen, E., Fernandez, K., Goldspink G., Butterworth, P., Urneda, P. K., Chang, K.C. (1991). Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS* 290: 73-76.
- Herrmann, et al. DNA vaccines against rotavirus infections, United States Patent 6,165,993 . December 26, 2000
- Hilleman R. (1995). DNA Vectors. Precedents and Safety. In *DNA Vaccine: A new era in Vaccinology*. *Annals of the New York Acad. Sciences*-772: 1-14.
- Hoffman, S.L., D.L., Deelan, M. Sedegah, R. Granzinski, H. Wang, K. Gowda, P. Hobart, M. Margalith, J. Norman, R.C. Hedstrom. (1995). Nucleic acid malaria vaccines: Current status and potential. In *DNA Vaccines: A new era in Vaccinology*. *Annals of the New York Acad. Sciences* 772:140-151.
- Höltje, J-V, Mirelman, D., Sharon, N., and Schwarz, U. (1975). Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124: 1067-1076.
- Höltje, J.V. and Schwarz, U. (1985). Biosynthesis and growth of murein sacculus. In *Molecular Cytology of Escherichia coli*, 77-119. Academic Press.
- Höltje, J.V. and Tuomanen, E.I. (1991). The murein hydrolases of *Escherichia coli*; properties, functions and impact on the course of infections *in vivo*. *J. Gen. Microbiol.* 137:441-451.
- Höltje, J.V. (1995). Lytic transglycosylases. *EXS* 75: 425-429.
- Höltje, J.V. (1996). From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 164:243-254.
- Johnston S.A., Barry, M.A. (1997). Genetic to genomic vaccination. *Vaccine*. 15(8): 808-809.
- Kanellos T., Sylvester 1., Howard C. and Russell H. (1999). DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish. *Vaccine*. 17: 965-972.
- Koonin, E.V. and Rudd, K.E. (1994). A conserved domain in putative bacterial and bacteriophage transglycosylases. *Trends Biochem. Sci.* 19: 106-107.



- Kurth R. (1995) Risk Potential of the Chromosomal Insertion of Forcing DNA. In DNA Vaccines: A new era in Vaccinology. Annals of the New York Acad. Sciences 772: 88.
- Kraft, A.R., Templin, M.F. and Höltje J-V. (1998). Membrane-bound lytic endotransglycosylase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol 180 (13), 3441-3447.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680.
- Larenas, J., Contreras, J., Smith, P. (1998). Estado Actual de la Piscirickettsiosis en Salmones. Aquatic 5:1-21.
- Liu ZJ., Zhu ZY., Roberg K., Faras A., Guise K., Kapuscinski AR., Hackett PB.(1990) Isolation and characterization of beta-actin gene carp (*Cyprinus carpio*). DNA Seq. 1(2):125-136
- Lommatzsch, J., Templin, M.F., Kraft, A.R. Vollmer, W. and and Höltje J-V. (1997). Outer membrane localization of murein hydrolases: MLTA, a third lipoprotein lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179(17): 5465-5470.
- Lowrie D.B., Silva C., Colston M., Ragno S., y Tascon R. (1997) Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. Vaccine 15 (8): 834-838.
- Lozes, E., Huygen, K., Denis, O. y otros (1997) Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the antigen 85. Vaccine 15: 830.
- Mauel, M.J., Giovannoni, S.J., Fryer, J.L. (1999). Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed spacer (ITS) and 23S ribosomal DNA sequencing. Dis. Aquat. Org. 26: 189-195.
- McClements, W.L. (1995). Prevention of lethal herpes simplex virus type-2 infection in mice by immunization with DNA. IBC Conference on Gene Therapy & Nucleic Acid Vaccines Strategies. Feb. 16-17, Bethesda, MD.
- McDonald, G.A., Anacker, R.L., Garjian, K. (1987) Cloned gene of *R. rickettsii* surface antigen. Science 235:83.
- Melly, M.A., McGee, Z.A. and Rosenthal, R.S. (1984). Ability of monomeric peptidoglycan fragments from *Neisseria gonorrhoeae* to damage human fallopian-tube mucosa. J. Infect. Dis. 149: 378-386.
- Montgomery, D.L., J.W. Shiver, K.R. Leander, H.C. Perry, A. Friedman, D. Martinez, J.B. Ulmer, J.J. Donnelly, M.A. Liu. (1993). Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: Optimization of DNA vectors. DNA Cell Biol. 12:777.



- Nichols, W.W., Ledwith B.J., Manam S.V., Troilo P.J.(1995). Potencial DNA vaccine integration into host cell genome. In DNA Vaccine: A new era in Vaccinology. Annals of the New York Acad. Sciences, 772: 30-39.
- Obach A., Galanti M. y Delhey R. (1998). Exitosa Investigación contra Rickettsia. Salmonoticias. N° 61. Pag. 10-11.
- Pellegrini, M., Marcotte, E.M., Thompson, M.J., Eisenberg, D. And Yeates, T.O. (1999). Assigning protein functions by comparative genome analysis: Protein phylogenetic profiles. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 96:4285-4288.
- Pizza M, Scarlato, V., Masignani, V., Giuliani, M., Aricó B, Comanducci, M., Jennings, G., Baldi, L., Bartolini, E., Capecchi, B., Galeotti, C., Luzzi, E., Manetti, R., Marchetti, E., Mora, M., Nuti, S., Ratti, G., Santini, L., Savino, S., Scarselli, M., Storni, E., Zuo, P. Broeker M., Hundt, H, Knapp, B., Blair, E., Mason, T., Tettelin, H., Hood, D., Jeffries, A., Saunders, N., Granoff, D., Venter, J, Moxon, E., Grandi, G., Rappuoli. (2000). Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. Science 287: 1816-1820.
- Robinson, H.L., L.A. Hunt, R.G. Webster. (1993). Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. Vaccine 11: 957.
- Romeis,T., Vollmer, W. and Höltje, J-V. (1993). Characterization of the three different lytic transglycosylases in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 111(2-3) 141-146.
- Rouse, B.T. (1995). Genetic vaccines against herpes simplex virus. IBC conference on Gene Therapy & Nucleic Acid Vaccine Strategies, Feb. 16-17, Bethesda, MD.
- Russell, P.M., T. Kanellos, 1.D. Sylvester, K.C. Chang, C.R. Howard. (1998). Nucleic acid immunization with a reporter gene results in antibody production in goldfish (*Carassius auratus L.*). Fish & Shellfish Immunology, 8(2): 121-128.
- Salmonoticias (Publicación de la Asociación de Productores de Salmón y Trucha de Chile A.G.) 1998: N°61, pag. 10-11; N°62, pag. 11; N° 63, pag. 29-31. 1999: N° 71, pag. 11-13, N° 72, pag 4-6 y 18-19.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, C.S.H., New York.
- Sedegah, M., R. Hedstrom, P. Hobart, S.L. Hoffman. (1994). Protection against malaria by immunization with circumsporozoite protein plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
- Sewell A., Gerth U., Price D., Purbhoo M., Boulter J., Gao G., Bell J., Phillips R. Y Jakobsen B.(1999) Antagonism of cytotoxic T-lymphocyte activation by soluble CD8. Nature Medicine 5(4): 399-404.



- Sinha, R.K. and Rosenthal, R.S. (1980). Release of soluble peptidoglycan from growing gonococci: demonstration of anhydro-muramyl-containing fragments. *Infection and Immunity* 29, 914-925.
- Smith, P.A., Contreras, J.R., Larenas, J.J., Aguillon, J.C., Garces, L.H., Fryer, J.L. (1997) Immunization with bacterial antigens: piscirickettsiosis. *Dev. Biol. Stand* 90:161-166.
- Stover, C.K., Marana, D.P., Carter, J.M., Roe, B.A., Mardis, E., Oaks, E.V. (1990). The 56-kilodalton major protein antigen of *Rickettsia tsutsugamushi* molecular cloning and sequence analysis of the sta56 gene and precise identification of a strain-specific epitope. *Infect. Immun.* 58: 2076-2084.
- Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., Takahashi, K., Oyanagi, M. (1985). Analysis of polypeptide composition and antigenic components of *Rickettsia tsutsugamushi* by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. *Infect Immun* 48: 671-5.
- Tang, D.C., M. Devit, S.A. Johnston.(1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152.
- Templin, M.F., Edwards, D.H. and Høltje, J.V. (1992). A murein hydrolase is the specific target of bulgecin in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 20039-20043.
- Ulmer, J.B., J.J. Donnelly, S.E. Parker, G.H. Rhodes, P.L. Feigner, V.J. Dwarky, S.H. Gromkowski, R.R. Deck., C.M. De Witt, A. Friedman, L.A. Hawe, K.R. Leander, D. Martinez, H.C. Perry, J.W. Shiver, D.L. Montgomery, M.A. Liu. (1993). Heterologous protein against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745.
- Ursinus, A. and Høltje, J.V. (1994). Purification and properties of a membrane-bound lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176 (2):338-343.
- van Asselt, E.J. and Dijkstra, B.W. (1999). Binding of calcium in the EF-hand of *Escherichia coli* lytic transglycosylase SLT35 is important for stability *FEBS Lett.* 458:429-435
- van Asselt, E.J. Dijkstra, A.J. Kalk, K.H. Takacs, B., Keck, W. And Dijkstra, B.W. (1999a). Crystal structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase SLT35 reveals a lysozyme-like catalytic domain with a EF-hand. *Structure Fold Des* 7 (10); 1167-1180.
- van Asselt, E.J., Thunnissen, A.M., Dijkstra, B.W. (1999b). High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase SLT70 and its complex with peptidoglycan fragment. *J. Mol. Biol.* 291 (4): 877-898.
- van Asselt, E.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W. (2000). Crystallographic studies of the interactions of *Escherichia coli* lytic transglycosylase SLT35 with peptidoglycan. *Biochemistry* 39:1924-1934.



- Vishwanath, S., McDonald, G.A., Walkins, N.G. (1990). A recombinant *Rickettsia conorii* vaccine protects guinea pigs from experimental boutonneuse fever and Rocky Mountain spotted fever. *Infect. Immun.* 58: 646-53.
- Vollmer, W., von Rechenberg, M., and Holtje, J-V. (1999). Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MLTA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274(10): 6726-6734.
- Von Rechenberg, M., Ursinus, A., and Holtje, J-V. (1996). Affinity chromatography as a means to study multienzyme complexes involved in murein synthesis. *Microb. Drug Resis.* 2:155-157.
- Vyas. N.K. Vyas.M.N. and Quicho, F.A. (1987). A novel calcium binding site in the galactose-binding protein of bacterial transport and chemotaxis. *Nature* 327:635-638.
- Waxman, D.J. and Strominger, J.L. (1983). Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 52:825-869.
- Whitton J., Rodriguez F., Zhang J., Hasset D.(1999). DNA Immunization: Mechanistic Studies. *Vaccine.* 17:1612-1619.
- Wolff, J.A., R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, P.L. Felgner. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465.
- Xiang, Z.Q., S. Spitalnik, M. Tran., W.H. Wunner., J. Cheng., H.C.J. Ertl. (1994). Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 199: 132.
- Xu, D., F.Y. Liew. (1994). Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* 12: 1534.



## REIVINDICACIONES

- 104812
1. Una vacuna de ADN, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende un fragmento de ADN que codifica para la proteína transglicosidasa lítica soluble (SLT70) o un fragmento de ADN que codifica para la proteína transglicosidasa lítica de membrana (MLT), ambas de *Piscirickettsia salmonis*, o una región inmunogénica de éstas, insertado en un plásmido vector adecuado para expresar la proteína correspondiente y generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.
  2. Una vacuna de ADN, de acuerdo a la reivindicación 1, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende un fragmento de ADN que codifica para la proteína transglicosidasa lítica soluble (SLT70) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta, insertado en un plásmido vector adecuado para expresar la proteína y generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.
  3. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho fragmento de ADN corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 o un fragmento de ésta.
  4. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 1, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado.
  5. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha proteína transglicosidasa lítica soluble de *Piscirickettsia salmonis* originada corresponde a la secuencia aminoácídica Sec Id N° 2 o una región inmunogénica de ésta.
  6. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 2 a 5, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho plásmido vector adecuado presenta las siguientes características a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del ARN mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección.



7. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 6, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicho plasmidio vector es el plasmidio pUK21-A2 u otro con características similares. (Figura 5)
8. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 2 a 7, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.
9. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 8, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Coho.
10. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 8, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.
11. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 8, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.
12. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 8, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es la trucha.
13. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 2 a 13, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, la pulverización o la inmersión.
14. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 2 a 12, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna comprende además una adjuvante adecuado.
15. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 2 a 14, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.
16. Un método para detectar la presencia de anticuerpos contra transglicosidasa lítica soluble de *P. salmonis* generados por la vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 2 a 15, **CHARACTERIZADO PORQUE** después de un tiempo se extrae sangre del vertebrado vacunado y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos



contra transglicosidasa lítica soluble de *P. salmonis* mediante ELISA u otro procedimiento conocido en el estado de la técnica para detectar anticuerpos.

17. Un procedimiento para la preparación de la vacuna de ADN contra *Piscirickettsia salmonis*, **CARACTERIZADO PORQUE** comprende las siguientes etapas:

- a) Clonar el fragmento de ADN que codifica para la proteína transglicosidasa lítica soluble de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta
- b) Insertarlo en un plásmido vector adecuado para expresar la proteína y generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

18. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 17, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho fragmento de ADN corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 o un fragmento de ésta.

19. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 17, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 1, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado.

20. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 17, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha proteína transglicosidasa lítica soluble de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácídica Sec Id N° 2 o una región inmunogénica de ésta .

21. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 17 a 20, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho <sup>plásmido</sup>plasmidio vector adecuado presenta las siguientes características a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del ARN mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección.

22. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 21, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho <sup>plásmido</sup>plasmidio vector es el <sup>plásmido</sup>plasmidio pUK21A2 <sup>Figura 5</sup>u otro con características similares.





23. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 17 a 22, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.
24. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 23, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Coho.
25. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 23, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.
26. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 23, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.
27. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 23, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es la trucha.
28. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 17 a 27, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha vacuna se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, la pulverización o la inmersión.
29. Un segmento de ADN purificado útil para la producción de una vacuna contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, **CARACTERIZADO PORQUE** codifica para la proteína transglicosidasa lítica soluble de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de esta.
30. Un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 29, **CARACTERIZADO PORQUE** corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 o un fragmento de ésta.
31. Un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 29, **CARACTERIZADO PORQUE** corresponde a una secuencia nucleotídica equivalente a Sec Id N° 1, de acuerdo al código genético o un fragmento de ésta.
32. <sup>370</sup> Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a las reivindicaciones 29 a 30 **CARACTERIZADO PORQUE** se emplea para la generación de respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.



33. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 32 **CARACTERIZADO PORQUE** dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.
34. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 33 **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Coho.
35. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 33 **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.
36. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 33 **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.
37. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 33 **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es la trucha.
38. Una vacuna recombinante para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados producida empleando el segmento de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 29 a 31, **CARACTERIZADA PORQUE** la proteína transglicosidasa lítica soluble de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de esta se produce empleando un vector de expresión y un hospedero adecuados.
39. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 38 **CARACTERIZADA PORQUE** dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.
40. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 39 **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Coho.
41. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 39 **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.
42. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 39 **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.
43. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 39 **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es la trucha.



44. Una vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 43 **CHARACTERIZADA PORQUE** dicho vector de expresión es un <sup>plasmidio</sup> plasmidio u otra construcción de ADN capaz de expresar la proteína transglicosidasa lítica soluble en un hospedero adecuado.
45. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 44 **CHARACTERIZADA PORQUE** dicho plasmidio es el vector pET32a. (Figura 2)
46. Una vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 45 **CHARACTERIZADA PORQUE** dicho hospedero es un microorganismo, una célula de insectos o una célula animal.
47. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 46 **CHARACTERIZADA PORQUE** dicho hospedero es preferentemente *E. coli*.
48. Una vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 47, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, la pulverización y la inmersión.
49. Una vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 47, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna comprende además un adjuvante adecuado.
50. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 49, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.
51. Un método para detectar la presencia de anticuerpos contra la transglicosidasa lítica soluble SLT70 generados por la vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 50, **CHARACTERIZADO PORQUE** después de un tiempo se extrae sangre del vertebrado vacunado y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra transglicosidasa lítica soluble mediante ELISA u otro procedimiento conocido en el estado de la técnica para detectar anticuerpos.
52. Una vacuna de ADN, de acuerdo a la reivindicación 1, **CHARACTERIZADA PORQUE** comprende un fragmento de ADN que codifica para la proteína



transglicosidasa lítica de membrana (MLT) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta, insertado en un plásmido vector adecuado para expresar la proteína y generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

53. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 52, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho fragmento de ADN corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id Nº 3 o un fragmento de ésta.

54. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 52, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id Nº 3, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado.

55. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 52, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha proteína transglicosidasa lítica de membrana de *Piscirickettsia salmonis* originada corresponde a la secuencia aminoácídica Sec Id Nº 4 o una región inmunogénica de ésta .

56. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 52 a 55, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho plasmidio vector adecuado presenta las siguientes características a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del ARN mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección.

57. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 56, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho plasmidio vector es el plasmidio pUK21-A2 (u otro con características similares).

58. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 52 a 57, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.

59. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 58, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Coho.



60. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 58, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.
61. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 58, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.
62. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 58, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es la trucha.
63. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 52 a 62, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, la pulverización o la inmersión.
64. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 52 a 63, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna comprende además un adyuvante adecuado.
65. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 52 a 64, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.
66. Un método para detectar la presencia de anticuerpos contra transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis* generados por la vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 52 a 65, **CARACTERIZADO PORQUE** después de un tiempo se extrae sangre del vertebrado vacunado y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra transglicosidasa lítica de membrana de *P. salmonis* mediante ELISA u otro procedimiento conocido en el estado de la técnica para detectar anticuerpos.
67. Un procedimiento para la preparación de la vacuna de ADN contra *Piscirickettsia salmonis*, **CARACTERIZADO PORQUE** comprende las siguientes etapas:
- a) Clonar el fragmento de ADN que codifica para la proteína transglicosidasa lítica de membrana de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta
  - b) Insertarlo en un plásmido vector adecuado para expresar la proteína y generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.



68. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 67, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho fragmento de ADN corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 3 o un fragmento de ésta.

69. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 67, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 3, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado.

70. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 67, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha proteína transglicosidasa lítica de membrana de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácidica Sec Id N° 4 o una región inmunogénica de ésta .

71. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 67 a 70, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho <sup>plasmidio</sup> plasmidio vector adecuado presenta las siguientes características a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del ARN mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección.

72. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 71, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho <sup>plasmidio</sup> plasmidio vector es el <sup>plasmidio</sup> plasmidio pUK21A2 <sup>(Figura 5)</sup> u otro con características similares.

73. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 66 a 72, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.

74. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 73, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Coho.

75. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 73, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.

76. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 73, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.



78. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 67 a 77, **CARACTERIZADO PORQUE** dicha vacuna se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, la pulverización o la inmersión.

80. Un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 79, **CARACTERIZADO PORQUE** corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 3 o un fragmento de ésta.

81. Un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 79, **CARACTERIZADO PORQUE** corresponde a una secuencia nucleotídica equivalente a Sec Id N° 3, de acuerdo al código genético o un fragmento de ésta.

82. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a las reivindicaciones 79 a  
80 **CARACTERIZADO PORQUE** se emplea para la generación de respuesta inmune  
contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

83. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 82 **CARACTERIZADO PORQUE** dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.

34. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 83 **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Coho.

35. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 83 **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.

86. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 83 **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.
87. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 83 **CARACTERIZADO PORQUE** dicha especie de acuicultura es la trucha.
88. Una vacuna recombinante para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados producida empleando el segmento de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 79 a 81, **CARACTERIZADA PORQUE** la proteína transglicosidasa lítica de membrana de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de esta se produce empleando un vector de expresión y un hospedero adecuados.
89. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 88 **CARACTERIZADA PORQUE** dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.
90. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 89 **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Coho.
91. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 89 **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.
92. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 89 **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.
93. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 89 **CARACTERIZADA PORQUE** dicha especie de acuicultura es la trucha.
94. Una vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 88 a 93 **CARACTERIZADA PORQUE** dicho vector de expresión es un <sup>plasmidio</sup> plasmidio u otra construcción de ADN capaz de expresar la proteína transglicosidasa lítica de membrana en un hospedero adecuado.
95. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 94 **CARACTERIZADA PORQUE** dicho <sup>plasmidio</sup> plasmidio es el vector pET32a. (Figura 9)





96. Una vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 88 a 95 **CARACTERIZADA PORQUE** dicho hospedero es un microrganismo, una célula de insectos o una célula animal.

97. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 96 **CARACTERIZADA PORQUE** dicho hospedero es preferentemente *E. coli*.

98. Una vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 88 a 97, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, la pulverización y la inmersión.

99. Una vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 88 a 97, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna comprende además un adyuvante adecuado.

100. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 88 a 99, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha vacuna comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.

101. Un método para detectar la presencia de anticuerpos contra la transglicosidasa lítica de membrana generados por la vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 88 a 100, **CARACTERIZADO PORQUE** después de un tiempo se extrae sangre del vertebrado vacunado y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra transglicosidasa lítica de membrana mediante ELISA u otro procedimiento conocido en el estado de la técnica para detectar anticuerpos.



ATGCCATACTACACTTTTATTTATCTTATTGCCCTGATGGTGAGTCTTTTTATTACTCAATCTTT  
 TTATGCCGCAAACCTATCTTAACCACTCTCTTGACAAACAACGCATATTTTTTTCACCAAGCAGAAC  
 AGCATTTAAAAAAAAGCCGTCTACAATCCTTCAAAAAAGAGTTAAGAAAACCTAACACACTACCCA  
 CTATATCCTTACCTGCGCTACCAAGAACTGATTCGCCAGCTTCAGCTTGGATTTTTTGCCAAATAA  
 TAAGATCAAGCACTTTCTAAATCAATATCAAAATACTATTTTTTCATGATCGTTTTACACCGCCAGT  
 GGATGATTACCTCTATAATAAAAAATGGTGGAACACTGATTAAATATTACCAACCGGCAACT  
 AAGAGCACTGCAATGCAATGTCGCTATCTATGGGCACGCTATCAGCTTAATTATCAACAGCAATC  
 ACTTCATGCCTTTAAAAAAGTCTGGCTACAAGGTCGCTCTTTACCTAAAGTATGTGATCGCCTTA  
 TCAGTGCATTACGCAAACATAAGCAACTTACCAACTCTCTGGCTTGGCAGCGTATTACCCTAGCA  
 ATGCAGAAAAGAAATTATCAGCTCGCCGGTTATTTAGCACGCTTTTTATCCAGTCAAGATAAAAA  
 AGCACTGACCCTCTGGCGTATTTTTGCGGCGCCACCCAGAAAAAATGACTAAACCTCTTTAATAC  
 GAGCCGCAGGCAATAAAGCTAATTATATTGCTAATGACACTTTATTGACGCTTGCCAAACGCAAA  
 CCAGAGTATGCTATAACAATCTGGCCGCGTTTAAAAAGCAAATTTTCTCTAACCAAACAACAAAA  
 AATAGCTATCACCAAGAGCATTGCTCTACACCTTGCTTTAAAAAATCTTCAAAAACATCGCACT  
 GGATGGAAAAAGTTCCAGATCAGGATCAAAGCTTAACCCTAACCTCCTGGAATATTTCGTACAGCA  
 CTTTATCAACAACGCTGGCAACACGCTCTTACCTTAATTAACAGCTTTCCTCCAAATGAGTACGA  
 TAGCCACCTATGGCAATACTGGAAAGCCCGTGCGCTAGAACAACCTGGCCAAATCACTCAGGCAA  
 AAAAAGTATATAAACGCCTTGCCAAACATCGCGACTACTATGGTTTTCTTGCTAGCAATAAATTA  
 CAGCAGCCTTATCAACTCAATAGAAAAGCCGTTAATATTAGCAAGCACATATTAAGCAATGTCTC  
 AAAAAACCTGGAATTAGGCGCGCTTATGAGTTTAAAAAACAGGACACCCAGGGCTTGCTCGTA  
 GTGAATGGGTATATGCCATTAACCAATTCAGTACAGACAGAAAACTGGCCGCGGCAAACTCGCA  
 CATGACTGGGGATGGTATAACCTCTCCGTATTAACCACCACAAAAACCAAGCACCGTGACGATTT  
 AAAGCTGCGCTTTCCTATGGCCCACTACCGTGCCATTTTACGCAATGCAAAACGTTATGAGATCA  
 GCCCAGCATGGGTATTTTCAGTCGCTCGCCAAGAAAGTATTTTTTCATGAACATGCTTACTCACCG  
 GTTGGCGCACGAGGGATTATGCAATTAATGCCTACAACAGCACGCTATATCGCAGGTAAAATACA  
 AATACGCCATTATACCTCCAAACTACTTGACGCCAACCATAATATCGCTTTAGGCACTGCCTATT  
 TAAAACGTTTATTAGAGCGCTATGATAACCGCTTAATTCTTGCTCTCGCCGCTTATAATGCTGGA  
 ATTAGGCGTGTTAATCAGGG

**FIGURA 1**



MPYYTFIYLIALMVSLFITQSFYAANYLNHSLDKQRIFFHQAEQHLKKSRLQSFKKELRKLTHYP  
LYPYLRYQELIRQLQLGFLPNNKIKHFLNQYQNTIFHDLHRQWMIHLYNKKWWKTLIKYYQPAT  
KSTAMQCRYLWARYQLNYQQQSLHAFKKVWLQGRSLPKVCDRLISALRKHKQLTNSLAWQRITLA  
MQKRNYQLAGYLARFLSSQDKKALTWRILRRHPEKMTKTSLIRAAGNKANYIANDTLLQLAKRK  
PEYAITIWPRLKSKFSLTKQQKIAITKSIALHLALKKSSKTSHWMEKVPDQDQSLTLTWNIRTA  
LYQQRWQHALTLINSFPNEYDSHLWQYWKARALEQLGQITQAKKVYKRLAKHRDYYGFLASNKL  
QQPYQLNRKAVNISKHILSNVSKKPGIRRAYEFKKTGHPGLARSEWVYAINQFTETEKLAALKLA  
HDWGWYNLSVLT TTKTKHRDDLKLRFPMAHYRAILRNAKRYEISPAWVFSVARQESIFHEHAYSP  
VGARGIMQLMPTTARYIAGKIQIRHYTSKLLDANHNIALGTAYLKRLRLERYDNRLILALAAYNAG  
IRRVNQ

## FIGURA 2



ATGAGACGATCTTATTGGCTAGGGTTACTTATATTTTTTAAATGGTTTTTTTATTACCACTCACGC  
GGCATCTAATACGCTTGCTGTTTTCTGCATCTACCAACTCTAAATCTGCTGAATATATTCAGCGTG  
CTGATGTAAAGTCTTATATTAATGATTTAGTAAACAATATGGTTTTAGCAAAGCACAGCTTGAG  
CGGTGGTTTTTCATCATGCTAAAGCTAATCAGCGTGCTCTGGAAATATTACAGCGTCCGGCAGAAAA  
AGTGTGGACATGGCAGCAGTATCGTAGTTGGCTGGTGTGACAAAACGAGCGAAAGAAGGCGCTG  
AGTTTTGGCAAAGTAATCGGCAGACATTAAGGCGAGCAGAGCGTATGTATGGTGTGCCACCACAG  
GTTATTTTTAGCCATTATTGGTGTAGAGAGCTCTTATGGAAAAAATGTCGGTGGTTTTCCAACCTT  
TAATGTACTAACAACGTTAGCGTTTGATTATAAGCGGCGCAGTGAGTTTTTTAAGCGTGAATTGA  
CTGAATTTTTTGCTGCTTATGCGTGATCAGAAAATGAATCCGATGCAAGTTCAAGGCTCTTATGCT  
GGAGCGCTAGGACTACCGCAGTTTATGCCAAGTAGCTATCGTTATTATGCGGTAGACTTTTCTGG  
TGATGGCCATAAAAAATTTATTTAGCAACGATGCTGATGTGATCGGTAGTATTGGAAATTATTTTA  
AACGTCATGGTTGGCCAGGTAATCAACCAATTGCAGTGAAAGCAAAAATATCCGGTGATCAATTT  
AATGCTATTATTAAAAATGGGTATTGAACCAAAATATACAGTCACTGAGTTGGCTAAGTTTGGTAT  
TGAGTCTCAGGAAAAAGTTGATCCTAGTTTAAAGGCAGCGCTTATTGAGTTAGATGGTAAAAATG  
GTCCTGAGTATTGGCTGGCTTTTCAGGATTTTTATGCCATCACACGCTATAATCACAGTCAAAAA  
TATGCAATGGCGGTGTATGATTTGAGTCAAGACATTGCTCATTATCGTCGTTTAGCACTGAAAGA  
AAGCCACTCAAAGGCTCTTAA

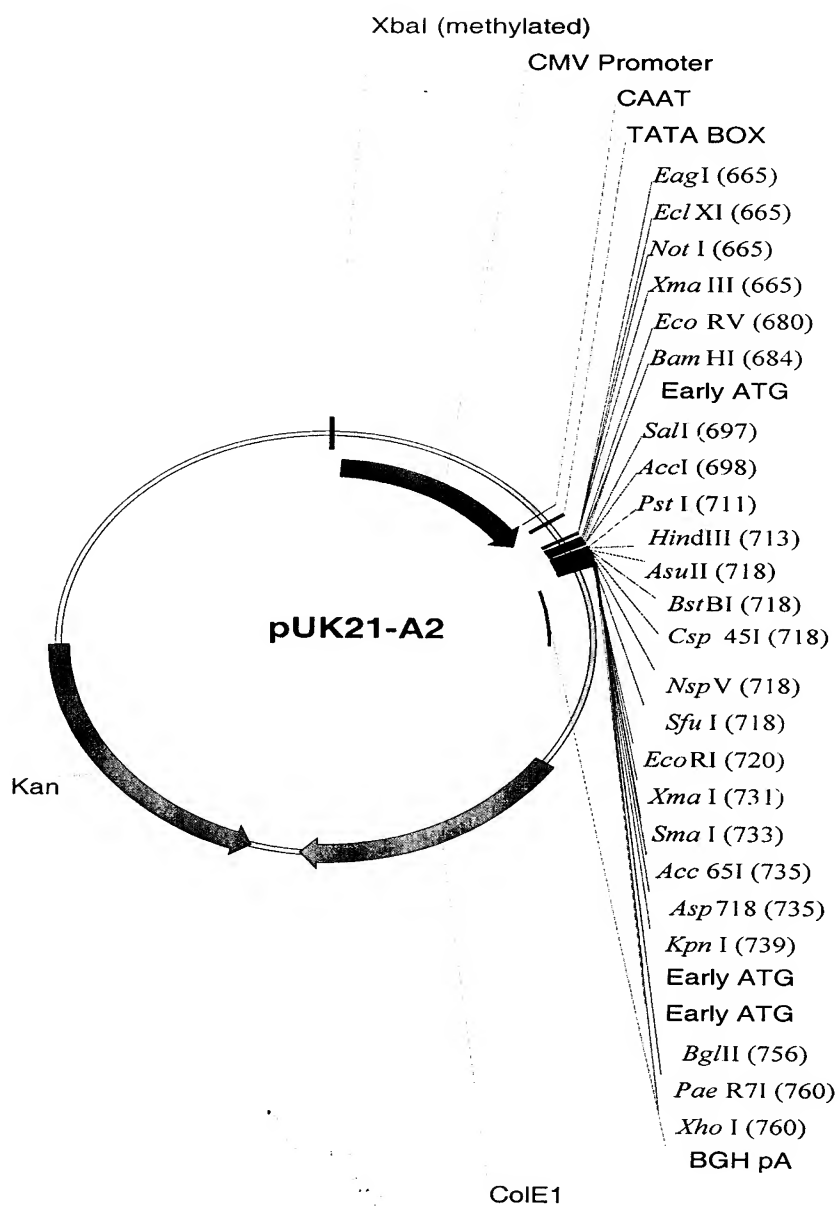
### FIGURA 3



MRRSYWLGLLIFLNGFFITTHAASNTLAVSASTNSKSAEYIQRADVKS  
SYINDLVKQYGFSSKAQLE  
RWFHHAKANQRALEILQRP  
AEKVWTWQQYRSWL  
VSTKRAKEGA  
EFWQSNRQTL  
RRAERMYGV  
PPQVILAIIG  
VESSYGKNV  
GGFPTFNV  
LTTLAFDY  
KRRSEFFK  
RELTEFL  
LLMRDQK  
MNP  
MQVQGSYA  
GALGLPQ  
FMPSSY  
RYYAVD  
FSGDGH  
KNLFS  
NDADVI  
GSIGNY  
FKRHG  
WPGN  
QPIAV  
KAKIS  
GDQF  
NAIIKM  
GIEPKY  
TVTE  
LAKFG  
IESQ  
EKVD  
PSLKA  
ALIELD  
GKNG  
PEY  
WLAFQ  
DFYAI  
TRY  
NHSQ  
KYAM  
AVYD  
LSQD  
IAHY  
RRLA  
LKES  
HSGS

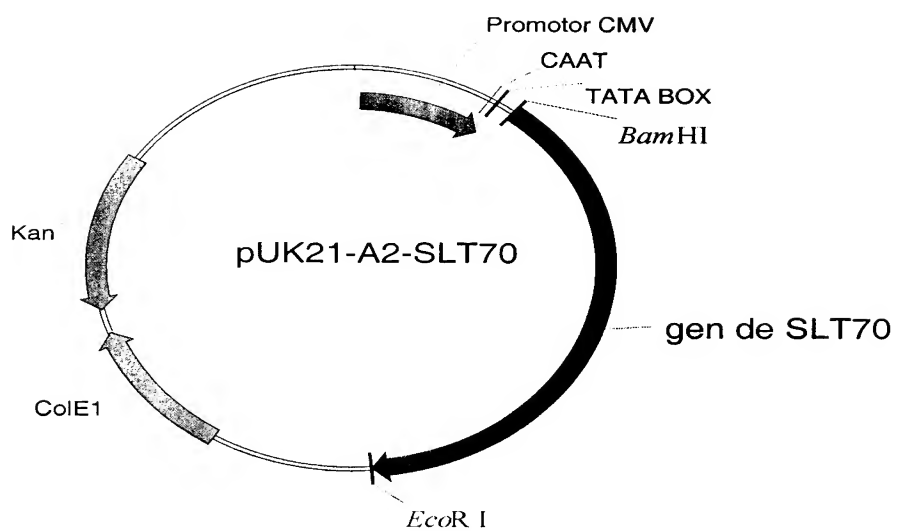
## FIGURA 4





**FIGURA 5**





**FIGURA 6**



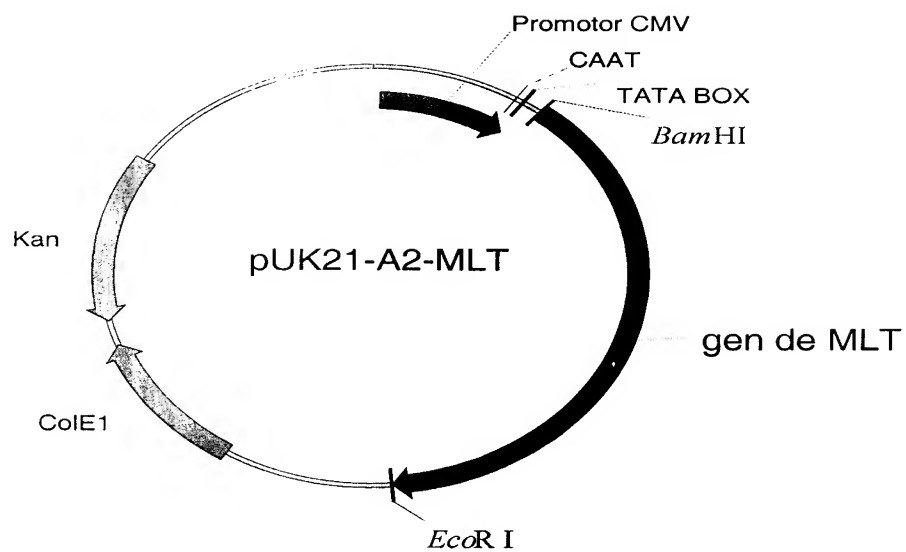
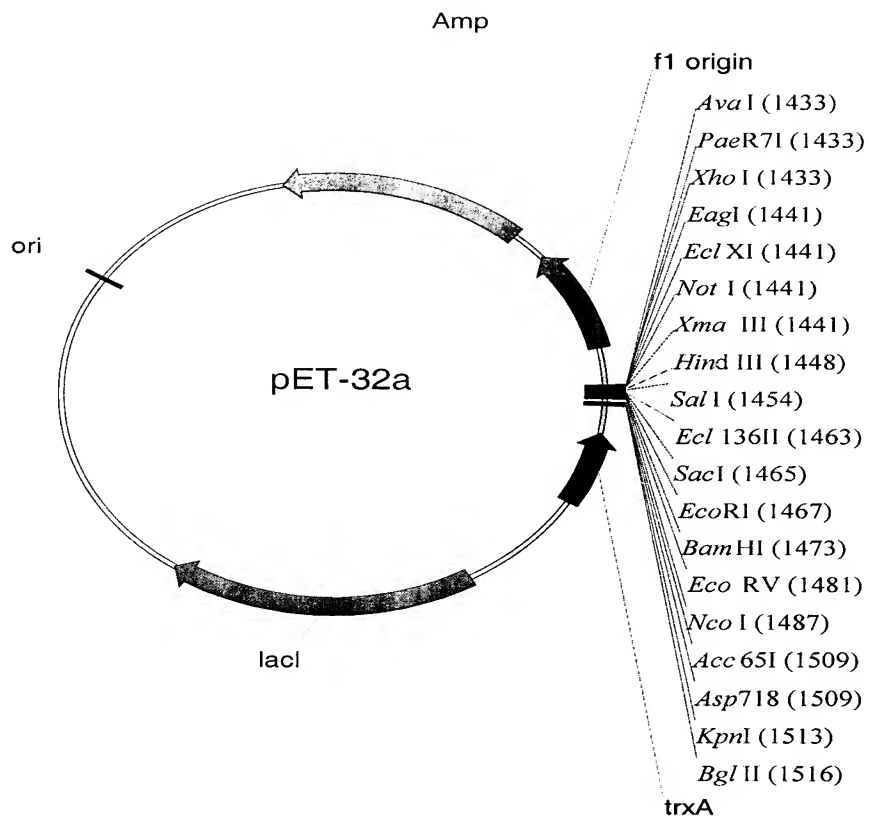


FIGURA 7







**FIGURA 8**



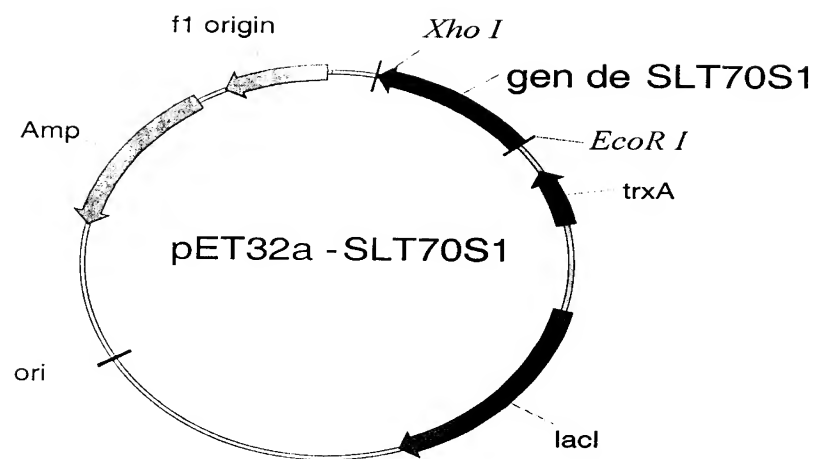


FIGURA 9





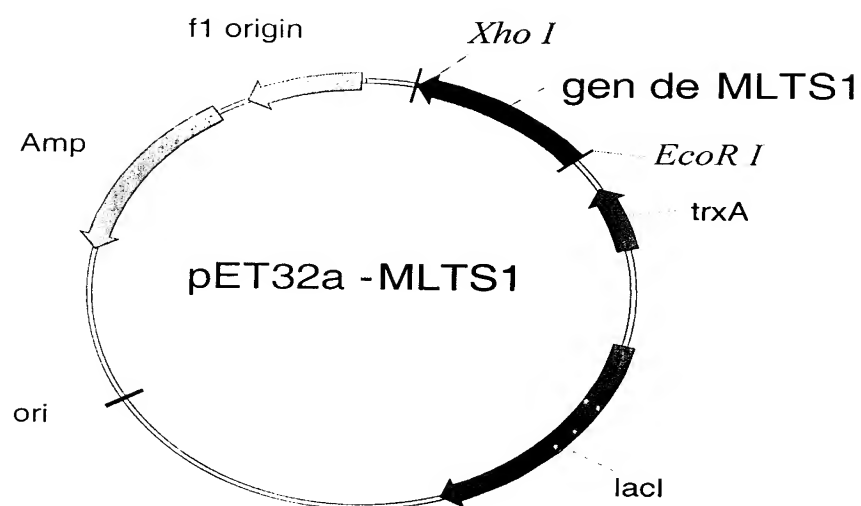


FIGURA 11



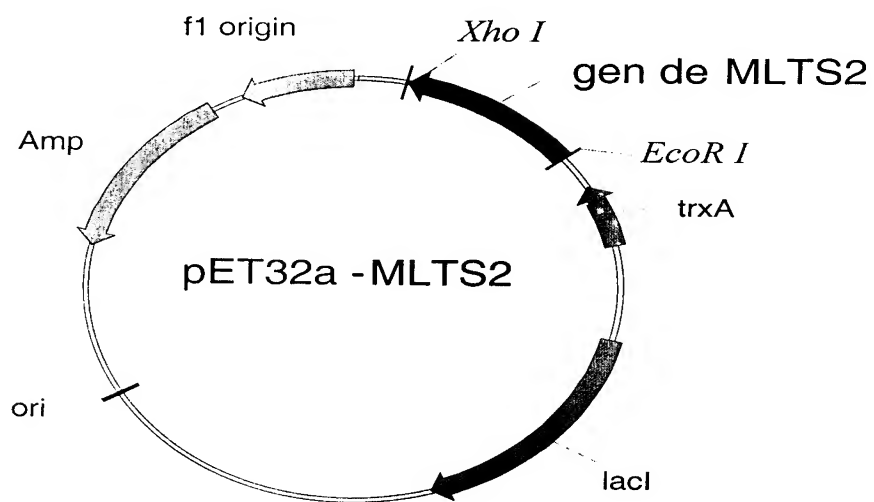


FIGURA 12

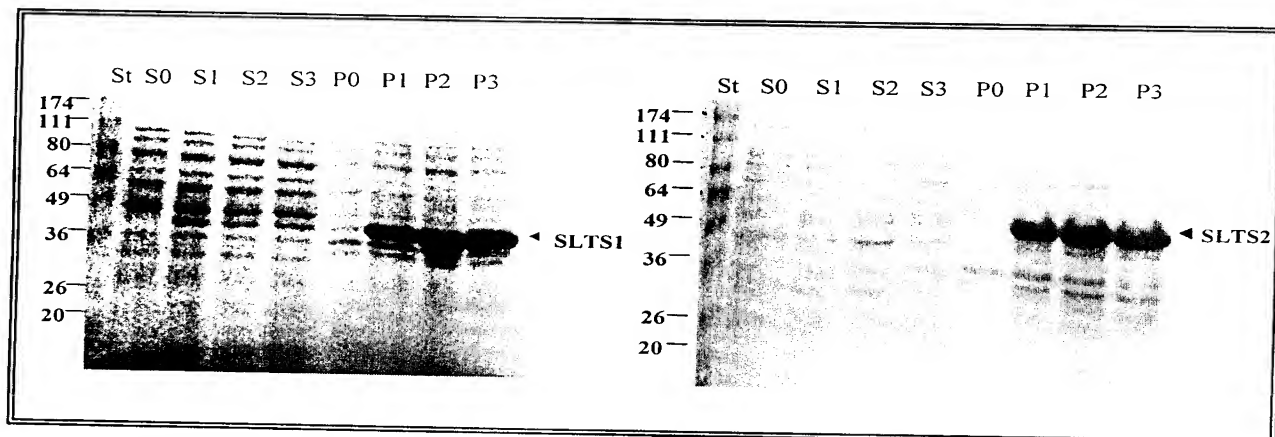


FIGURA 13



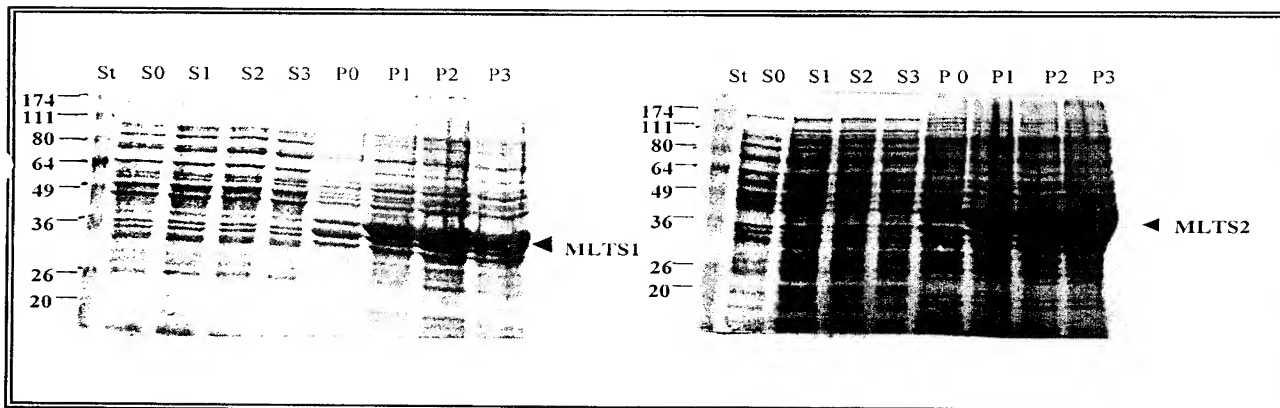


FIGURA 14

